

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Тимербаева Вадима Рафаиловича «Создание безмаркерных растений томата и яблони с геном суперсладкого белка», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология

Представленная диссертационная работа Тимербаева Вадима Рафаиловича посвящена созданию безмаркерных трансгенных растений томата и яблони с улучшенными вкусовыми свойствами плодов благодаря внедрению в растения гена суперсладкого белка тауматина под, большей частью, плодоспецифичным промоторами *E8* и *ELIP*. Актуальность исследования обусловлена двумя основными проблемами, стоящими перед современной биологией: во-первых, предвзятым отношением потребителей к генетически модифицированным организмам, что требует от создателей таких организмов разработки механизмов трансформации, которые позволят полностью элиминировать нецелевые чужеродные участки, внедрившиеся в геном вместе с целевым геном. Во-вторых, поиск и исследование тканеспецифических промоторов, регулирующих экспрессию генов в конкретных тканях и/или на определенных стадиях онтогенеза – важнейшее фундаментальное направление современной биологической науки, которое позволяет постепенно, с большим трудом приоткрывать регуляторные генетические механизмы.

Именно эти направления исследований Тимербаева В.Р. и определяют актуальность его диссертационной работы, а полученные результаты имеют несомненную научную и практическую ценность.

Автором были сформулированы десять задач, которые охватывают весь комплекс работ, необходимый для достижения поставленной цели, и включают в себя работы по получению трансгенных томатов с встроенным репортерным геном *gusA* под различными вариантами промотора *ELIP*, позволяющие оценить структуру и функционал данного промотора, а также работы по получению безмаркерных трансгенных растений томата и яблони.

Диссертация Тимербаева В.Р. состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Диссертация состоит из 145 страниц и включает 22 рисунка, 12 таблиц и список литературы из 197 источников, причем из них 195 англоязычных.

Во «Введении» автор описывает актуальность и современное состояние научной проблемы, формулирует цель и задачи исследования, обосновывает теоретическую и практическую значимость исследования, формулирует основные положения, выносимые на защиту.

Глава «Обзор литературы» состоит из трех основных частей. В первой части обзора подробно описаны известные науке типы промоторов, при этом особое внимание уделено промоторам томатов как основному и наиболее изученному организму, которому посвящена настоящая диссертационная работа. Вторая часть обзора посвящена описанию способов получения трансгенных растений, где особое внимание уделено известным методам удаления маркерных генов и отбора безмаркерных регенерантов. В третьей части обзора автор сосредоточился на сведениях о белке тауматин II, внедрение которого в геном томата и яблони и является целевым результатом работы.

В главе «Материалы и методы» описаны объекты и методы исследований, которые были использованы в работе. Описанные в этой главе методы соответствуют поставленным задачам и включают классические и современные биоинформатические способы обработки данных, биотехнологии генетической инженерии и молекулярной биологии.

Глава 3 диссертационной работы посвящена результатам исследования и разделена на три части. Первая из них содержит сведения о клонировании и анализе целевого растительного промотора *ELIP* с подробным описанием элементов вовлеченных в его функционал, а также подробными результатами гистохимического и количественного анализа активности делеционных и полного вариантов промотора *ELIP* в различных органах томата, в том числе плодах, с использованием маркерного гена GUS. Вторая и третья части главы посвящены непосредственно созданию безмаркерных растений томата и яблони соответственно. Причем ген тауматина II был введен в томат под двумя промоторами (E8 и *ELIP*), а в яблоню только под одним – E8. Следует отметить, что для удаления маркерных генов в томате, диссертант использовал две стратегии отбора трансформантов – быстрой и отсроченной селекции.

Полученные экспериментальные результаты обсуждаются в главе 4 и структурно согласуются с главой 3. Особое место в этой главе автор уделяет промотору *ELIP*, функциям различных его участков, возможному происхождению и существующим гомологам.

Выводы диссертационной работы следуют из проведенных исследований, четко сформулированы и согласуются с целями и задачами работы, полученным экспериментальным данным, изложенным в предыдущих работах.

Завершает работу автора список сокращений и условных обозначений и подробный список использованной литературы.

В ходе работы над диссертацией автором выполнен значительный объем работы, получены экспериментальные данные, которые были систематизированы и изложены в доступной форме научным языком. Внутренняя логика исследования прослеживается на протяжении всей диссертационной работы, все ее части согласованы друг с другом и расположены согласно логике исследования.

Обоснованность полученных результатов подтверждена полученными экспериментальными данными, а достоверность исследований подтверждается рациональным выбором используемых методов. По итогам проведенных исследований автором опубликовано четыре статьи в журналах, индексируемых в ведущих научных базах данных – Scopus и WOS.

Научная новизна исследования заключается в полученных новых данных о механизмах регуляции экспрессии генов, выделении и анализе нового, преимущественно плодоспецифичного, промотора ELIP, использование которого позволит расширить возможности генетической инженерии. Дополнительно было показано, что ранее позиционируемый как плодоспецифичный промотор E8 может работать в других частях растений.

Автор также выделяет методологические сложности и недостатки, которые были выявлены в процессе проведения экспериментальной части работы, что задает вектор дальнейшего совершенствования технологии трансформации и удаления маркерных генов.

Работа имеет также большую практическую значимость, поскольку использование плодоспецифичных промоторов позволяет получать улучшенные сельскохозяйственно значимые растения, экспрессирующие целевые гены преимущественно в плодах, а технология удаления маркерных генов потенциально позволяет упростить выпуск таких организмов в открытое производство.

Диссертационная работа не содержит серьезных изъянов, однако в ней 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 и 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.

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.

Тем не менее, приведенные мелкие замечания не снижают общей ценности проделанной работы, нисколько не умаляют научно-практической значимости полученных результатов, правомерности основных защищаемых положений и выводов представленной диссертационной работы.

Таким образом, диссертация Тимербаева Вадима Рафаиловича является законченной научно-квалификационной работой и соответствует всем критериям (в том числе п.9), установленным "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), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Ведущий научный сотрудник,  
к.б.н.  
руководитель группы  
биоинженерии растений  
Федерального государственного  
учреждения «Федеральный  
исследовательский центр  
«Фундаментальные основы  
биотехнологии» Российской  
академии наук»

Камионская Анастасия  
Михайловна

119071, Москва, Ленинский  
проспект, д. 33, с. 2  
Тел. (499)135-12-29 доб. 263.  
E-mail: akatio@biengi.ac.ru

Подпись к.б.н. Камионской А.М.  
«Удостоверяю»  
Ученый секретарь ФГУ ФИЦ  
«Фундаментальные основы  
биотехнологии» РАН, к.б.н.



Орловский  
Федорович

Александр

« 21 » мая 2020 г.