



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН**

ул. Вавилова д. 26, Москва, 119334  
Тел.: (499) 135-33-22. Факс (499)135-80-12. E-mail: info@idbras.ru  
ОКПО: 02699062 ОГРН 1027700450800 ИНН/КПП 7736044850/773601001  
http://idbras.ru

На № 14.05.2020 № 12506/01-106  
4.10-48-774 от 24.04.2020

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального  
государственного бюджетного  
учреждения науки Институт биологии  
развития им. Н.К. Кольцова РАН,  
д.б.н., член-корреспондент РАН  
Васильев Андрей Валентинович



« 14.05.2020 » 2020 г.

ОТЗЫВ ведущей организации  
о научно-практической значимости диссертации **Тимербаева Вадима Рафаиловича** «Создание безмаркерных растений томата и яблони с геном суперсладкого белка», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

**Актуальность темы выполненной работы.** Присутствие генов устойчивости к антибиотикам в трансгенных растениях вызывает обеспокоенность общества из-за потенциальных рисков для окружающей среды и здоровья человека. Следует отметить, что в настоящее время отсутствуют доказательства опасности генетически модифицированных организмов. Тем не менее, есть основания полагать, что получение и коммерциализация трансгенных растений без чужеродного генетического материала, в первую очередь бактериального и вирусного происхождения, позволит снизить эту напряженность, тем самым сделать такие растения более привлекательными для потребителей. Один из современных подходов, позволяющих создавать такие растения – применение сайт-

специфических рекомбиназ, которые позволяют элиминировать селективные гены из уже отобранных трансгенных линий.

Одной из основных задач при получении новых сортов трансгенных растений с хозяйственно ценными признаками является обеспечение высокого уровня экспрессии целевого гена, что может быть определено свойствами промоторных участков. От них может зависеть не только уровень экспрессии контролируемого им гена, но и тканевая специфичность. Несмотря на активный поиск сильных тканеспецифичных промоторов, их выбор остается ограниченным. При этом необходимо понимать, что каждый промотор обладает специфическим набором характеристик, среди которых чаще всего присутствуют те или иные недостатки, ограничивающие его применение. В связи с этим работы, направленные на поиск и исследование новых тканеспецифичных промоторов, не теряют своей актуальности.

Методы традиционной селекции, направленные на улучшение вкуса плодов сельскохозяйственно-значимых культур, во многом исчерпали себя из-за ограниченности набора генов. В этом случае генетическая инженерия позволяет значительно расширить возможности исследователей. Так, усилить сладость плодов томата и яблони, и повысить их потребительскую привлекательность возможно за счет экспрессии в растениях гена суперсладкого белка тауматина из тропического растения катемфе.

#### **Научная новизна исследования.**

Автором впервые клонирован и охарактеризован промотор гена раннего светоиндуцибельного белка томата. В его последовательности выявлены цис-регуляторные элементы. Функциональный анализ промотора *ELIP* выявил, что его полная версия способна обеспечивать высокий уровень экспрессии репортерного гена в спелых плодах томата. Выявленные мотивы в последовательности промотора, возможно, позволят в дальнейшем идентифицировать новые регуляторные цис-элементы. Результаты, изложенные в диссертации, пополняют знания о взаимосвязи между структурой и функцией промоторных регионов генов растений. Описанный новый промотор гена *ELIP* является перспективным инструментом для применения в биотехнологии растений.

Впервые промотор *ELIP* использован для целевой наработки белка в плодах томата. Впервые показано, что классический промотор томата *E8* не обладает строгой плодовой специфичностью. 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.

**Практическое значение.** Новый 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.

В диссертационной работе разработаны протоколы, которые позволяют получить безмаркерные растения томата и яблони, с использованием системы rMF1. Для растений томата при этом были использованы две стратегии получения безмаркерных линий – быстрая и отсроченная. Полученные при разработке протоколов данные позволили выявить недостатки, а также тонкие методологические особенности системы отбора безмаркерных растений, что позволит в будущем планировать и проводить эксперименты с большей эффективностью. Использование современных методов и подходов (и участие в их разработке) позволяет сохранять конкурентоспособность российских ученых в области молекулярной биологии и биотехнологии растений. При изменениях законодательства России созданные растения можно будет использовать для коммерциализации и выпуска их в открытые системы.

**Структура и содержание диссертационной работы.** Диссертация построена по классическому плану и содержит Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, включающий 197 источника. Работа изложена на 145 страницах текста, имеет 22 рисунка и 12 таблиц.

Во Введении автор описывает тематику своей работы, ее актуальность и степень разработанности, формулирует цели и задачи исследования, кратко описывает новизну, теоретическую и практическую значимость работы. Также во

Введении перечислены методы, использованные диссертантом, и положения, выносимые на защиту. В конце Введения дан список конференций, на которых были представлены результаты, список научных публикаций, и описан личный вклад автора.

Обзор литературы включает три раздела, посвященных описанию промоторов растений, методов получения безмаркерных растений, дана характеристика суперсладкого белка тауматина. Материал лаконично изложен и даёт представление о современных проблемах в заявленной тематике. В главе «Материалы и методы» достаточно подробно описаны использованные диссертантом методики, перечислены используемые приборы и реактивы.

В главе «Результаты» последовательно представлены результаты, полученные с помощью многочисленных методов. причем большая часть из них сопровождается таблицами и рисунками.

В диссертационной работе для обеспечения высокой экспрессии гена тауматина в плодах томата и яблони автор клонировал и охарактеризовал промотор гена раннего светоиндуцибельного белка (ELIP) томата. Белки этого семейства продуцируются в присутствии света, играют фотовосстановительную роль в фотосинтетической системе и принимают участие в конверсии хлоропласта в хромопласт. В последовательности промотора выявлено большое количество цис-регуляторных элементов, ответственных за реакции на свет, фитогормоны (в том числе на этилен), циркадианный контроль и других. Для выяснения функциональности промотора семь делеционных вариантов, включая полную версию были слиты с репортерным геном  $\beta$ -глюкуронидазы (*gusA - uidA*) и интродуцированы в геном томата. Гистохимический анализ различных органов трансгенных растений томата выявил различающиеся уровни активности GUS в большинстве анализируемых тканей. Максимальная интенсивность синего окрашивания была обнаружена в спелых плодах и практически отсутствовала в корнях. Флюориметрическим методом автору удалось выявить, что полная версия промотора *ELIP* обладает силой конститутивного промотора CaMV35S.

В диссертационной работе автор использовал охарактеризованный сильный

промотор для направленной экспрессии гена тауматина II в плодах томата, а также промотор *E8* для экспрессии в плодах яблони. Основным заявленным преимуществом системы rMF1, выбранной для создания безмаркерных растений, является ее последовательная двойная селекция. Система включает в себя индуцибельную сайт-специфическую рекомбиназу и бифункциональный селективный ген. В качестве смыслового был взят ген суперсладкого белка тауматина II из растения *Thaumatococcus daniellii*. Для разработки протокола получения полностью безмаркерных растений томата автор применил две стратегии быстрой и отсроченной селекции. Трансгенная природа линий томата была подтверждена с помощью полимеразной цепной реакции и Саузерн-блоттинга. Экспрессия гена тауматина II была детектирована с помощью ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией и Вестерн-блоттинга, при этом плоды трансгенных и безмаркерных линий томата продемонстрировали сладкий вкус. Количественная сравнительная оценка уровня экспрессии белка тауматина под контролем двух промоторов была проведена с использованием иммуноферментного анализа. Накопление тауматина в плодах доходило до 3,7% от общего растворимого белка.

В диссертации описано получение трех независимых трансгенных линий яблони, которые были проанализированы на присутствие всех генов из области T-ДНК. Обнаружено, что две из них содержали неполную вставку T-ДНК. Оставшуюся линию третью линию, автор использовал для получения безмаркерных растений яблони, применив отсроченную стратегию. После индукции рекомбиназной активности в эксплантах листьев было получено более 40 сублиний, растущих на селективной среде с 5-флюороцитозинном. В этих растениях яблони на уровне РНК показана экспрессия гена сверхсладкого белка в широком диапазоне. Сублинии с высоким уровнем экспрессии целевого гена были размножены и привиты на карликовый подвой для ускоренного плодоношения. Автор планирует в дальнейшем оценить уровень белка в плодах яблони и провести органолептический анализ.

Глава «Обсуждение» вынесена в отдельную главу, которая в свою очередь разбита на разделы посвященные анализу нового промотора, получению безмаркерных растений томата и получению безмаркерных растений яблони. В этой

главе автор сравнил полученные им результаты с современными исследованиями в соответствующих научных областях. В Заключении кратко изложены результаты работы, за ними следуют обоснованные и четко сформулированные выводы. Цель работы и поставленные задачи были успешно выполнены. Выводы соответствуют цели и задачам исследования.

Автореферат содержит всю необходимую информацию и полностью соответствует диссертации. Необходимо отметить аккуратное оформление работы. Текст диссертации написан грамотным научным языком.

Высокий уровень работы, а также достоверность полученных результатов подтверждается списком публикаций, состоящем из 4 статей, опубликованных в иностранных научных журналах, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus.

Тем не менее, по работе имеется ряд незначительных **замечаний**:

- В обзоре литературы хотелось бы видеть иллюстративный материал, способствующий лучшему восприятию изложенной информации.

- На рисунке 1 не переведены на русский язык обозначения размера делеционных вариантов промотора  $\nu p$  на п.н.

- В работе имеется некоторое количество опечаток.

Высказанные замечания не умаляют научной ценности представленной работы и имеют, в первую очередь, технический характер.

Диссертационная работа Тимербаева В.Р. выполнена в лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений Филиала ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Пушино). Тематика диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Тимербаева Вадима Рафаиловича «Создание безмаркерных растений томата и яблони с геном суперсладкого белка», выполненная под руководством д.б.н. Долгова Сергея Владимировича, является

завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научно-методологическом уровне с использованием современных методов исследования. Результаты, приведённые в работе, представляют высокую значимость для решения проблем получения генно-инженерных форм растений. Диссертационная работа по содержанию, актуальности, новизне, научному и методическому уровню, практической ценности полученных результатов полностью 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.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании объединенного семинара профильных лабораторий ИБР РАН, (протокол № 2 от 13.05.2020 г.).

Руководитель группы  
клеточных и генетических основ  
развития растений ФГБУН  
Институт биологии развития  
им. Н.К. Кольцова РАН,  
д.б.н., профессор

Гапоненко Александр Константинович

119334, Москва, Вавилова, 26  
Тел: (499)135-33-22  
E-mail: akgaпоненко@gmail.com

Подпись Гапоненко А.К. заверяю,  
ученый секретарь ИБР РАН, к.б.н.



Хабарова Марина Юрьевна