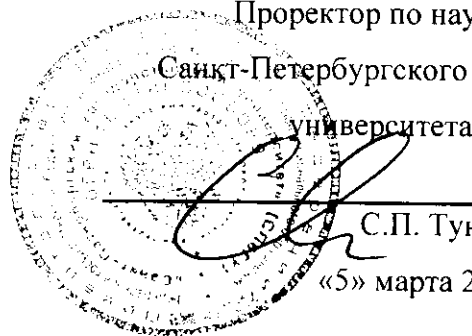


«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе

Санкт-Петербургского государственного  
университета



С.П. Туник

«5» марта 2015 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ) на диссертацию Колачевской Оксаны Олеговны «Влияние гена биосинтеза ауксина *tms1* под контролем клубнеспецифичного промотора на клубнеобразование картофеля *in vitro*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений

Ауксины являются важнейшими фитогормонами, поэтому им всегда уделялось и продолжает уделяться первостепенное внимание со стороны биологов растений. Ауксины участвуют в регуляции широкого спектра процессов, определяющих характер роста и развития растений. Однако до недавнего времени было неизвестно, участвуют ли ауксины в таком экономически важном процессе, как клубнеобразование у картофеля. Этому вопросу, а именно исследованию возможной роли ауксина в регуляции формирования клубней картофеля, и посвящена диссертация Оксаны Олеговны Колачевской. С помощью генно-инженерных методов ею созданы трансгенные формы картофеля с локальным повышением уровня ауксинов, и эти растения показали повышенную продуктивность при их культивировании при различных составах среды и режимах освещения. В этой связи актуальность данного исследования и его практическая значимость не вызывают сомнений.

Для изменения ауксинового статуса растений картофеля в работе была применена тактика введения в растения агробактериального гена *tms1*, белковый продукт которого катализирует реакцию превращения триптофана в индол-3-ацетамид, который в свою очередь является прямым предшественником ауксина у агробактерий. Однако для картофеля наличие данного двухстадийного пути биосинтеза ауксина не было доказано, поэтому одной из основных целей работы было изучение влияния экспрессии трансгена *tms1* на эндогенное содержание ауксина. Ген *tms1* был поставлен под контроль клубнеспецифичного В33-промотора гена пататина класса I, чтобы не допустить чрезмерного роста концентрации

ауксина в вегетативных частях растений. В случае реализации ожидаемого локального повышения уровня ауксина в качестве следующей цели работы предполагалось изучение способности трансформантов к клубнеобразованию в различных условиях культивирования.

Как показало проведенное исследование, исходный замысел оказался правильным и полученные трансгенные растения картофеля действительно имели повышенный уровень ауксина в клубнях. Эти же трансформанты отличались повышенной продуктивностью по сравнению с исходными растениями, особенно при культивировании в неблагоприятных для клубнеобразования внешних условиях. Увеличение урожайности коррелировало с повышением уровня ауксина в клубнях. Эти приоритетные результаты важны с позиций как фундаментальной науки, так и перспектив их практического использования в практике растениеводства.

Диссертация О.О. Колачевской построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения собственных результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 140 источников, в основном англоязычных. В вводной части диссертант аргументирует выбор темы исследования и отмечает поставленные в работе цель и задачи.

В обзоре литературы, состоящем из 3-х основных разделов, подробно освещены вопросы регуляции клубнеобразования картофеля внешними и внутренними факторами, методологических аспектов генетической инженерии растений, путей биосинтеза ауксина в растениях. В целом обзор литературы демонстрирует эрудицию О.О. Колачевской в данной области исследований и служит теоретическим обоснованием цели и стратегии диссертационной работы.

Методическая часть диссертации отражает высокий экспериментальный уровень проведенной работы. Этот раздел включает генно-инженерные методы получения трансгенных растений методом агробактериальной трансформации; анализ геномной ДНК и экспрессии трансгенов методами полимеразной цепной реакции (ПЦР), в том числе в режиме реального времени; определение содержания фитогормонов методом ультра-разрешающей жидкостной хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией. Широта и разнообразие использованных подходов показывают основательную методическую подготовку О.О. Колачевской и освоение ей целого ряда молекулярных, биохимических, физиологических и генно-инженерных методов, используемых в современной биологии растений.

В разделе «Результаты» О.О. Колачевская описывает основные этапы своей работы. Первая глава этого раздела посвящена доказательствам встраивания в геном и экспрессии трансгена *tms1*. Во второй главе представлен количественный анализ экспрессии гена *tms1* в клубнях и побегах 4-х независимых линий трансформантов. Третья-пятая главы описывают

результаты определения содержания эндогенной ИУК и других фитогормонов в клубнях и побегах трансформантов. В шестой главе показаны данные о влиянии экспрессии трансгена *tms1* на динамику образования клубней. Наконец, седьмая глава посвящена оценке влияния экзогенных гормонов на способность к клубнеобразованию независимых линий трансформантов.

Среди основных результатов диссертации следует отметить получение впервые в мире трансгенных растений картофеля, экспрессирующих агробактериальный ген биосинтеза ауксина *tms1* под контролем клубнеспецифического промотора гена пататина класса I. Представлены убедительные доказательства органоспецифичной экспрессии гена *tms1* в трансгенных растениях, вызывающей значительное увеличение содержания ауксина в клубнях, но не в побегах В33-*tms1* трансформантов картофеля. Обнаружено, что в результате трансформации картофеля геном *tms1* изменялось содержание в клубнях не только ИУК, но и некоторых других фитогормонов, в частности, жасмоновой и салициловой кислот. Установлено, что В33-*tms1* трансформанты картофеля отличаются повышенным уровнем клубнеобразования *in vitro* в большинстве испытанных условий освещения и содержания сахарозы в среде, а известное позитивное влияние экзогенных гормонов (ИУК и кинетина) на клубнеобразование существенно снижено у трансгенных растений по сравнению с контролем. Таким образом, получены важные свидетельства наличия у картофеля двухстадийного пути биосинтеза ИУК с индол-3-ацетамидом в качестве промежуточного продукта, а также участия ауксина в регуляции клубнеобразования у этой культуры.

При этом впервые предложен и осуществлен способ повышения урожайности картофеля путем органоспецифичного увеличения содержания ауксина за счет экспрессии рекомбинантной полинуклеотидной последовательности В33:*tms1* преимущественно в клубнях. Эти новые научные результаты представляют несомненный интерес, так как показывают конкретные пути направленного изменения генома картофеля с перспективой повышения продуктивности этой экономически важной с/х культуры.

Вместе с тем, к представленной диссертации можно сделать некоторые замечания.

В подписи к графику эндогенных концентраций разных фитогормонов (Рис.10 диссертации и Рис.5 автореферата) не указано, что обозначают столбики разного цвета. В таблицах с надстрочными буквами (очевидно, отражающих статистическую достоверность различий) нет объяснений этих обозначений. В автореферате последние тезисы в списке публикаций ошибочно обозначены номером 29 вместо правильного номера 19.

Однако указанные замечания носят частный характер и не влияют на общую положительную оценку представленной работы.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Основные результаты

работы опубликованы в 6 статьях, том числе в таких высокорейтинговых журналах, как «J. Integrative Plant Biology», «Физиология растений» и «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова». Полученные результаты доложены на представительных российских и международных конференциях. Выводы диссертации хорошо аргументированы и не вызывают сомнений. Автореферат диссертации и приведенные в нем публикации автора полностью отражают содержание работы.

Результаты работы, выполненной О.О. Колачевской, могут быть использованы в исследованиях по физиологии и биохимии растений в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, Санкт-Петербургском государственном университете, Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Российском государственном аграрном университете – МСХА имени К.А. Тимирязева и др. Эта работа может представить также интерес для научных учреждений, специализирующихся на изучении и селекции картофеля, таких, как ВНИИ картофельного хозяйства им. Лорха, Институт картофелеводства (Беларусь) и др.

Диссертационная работа О.О. Колачевской полностью отвечает всем требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, а сам автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Диссертация и отзыв обсуждены на заседании кафедры физиологии и биохимии растений биологического факультета СПбГУ от «5» марта 2015 года (протокол № 9 ).

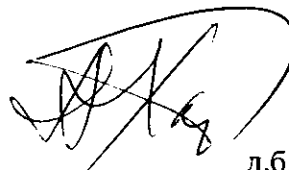
Отзыв составлен зав. кафедрой физиологии и биохимии растений СПбГУ, профессором С. С. Медведевым.

Зав. кафедрой физиологии и биохимии растений  
Санкт-Петербургского государственного университета



д.б.н., проф. С. С. Медведев

Декан биологического факультета СПбГУ



д.б.н., проф. А.Д. Харазова