

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Ордена Трудового Красного Знамени
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

**ИНСТИТУТ
ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ
им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук**

127276, Москва, И-276, Ботаническая ул., 35
Тел. (499) 977-80-22, Факс (499) 977-80-18
E-mail: ifr@ippras.ru

27.04.2015 г. № 12313/9311-

На № _____

“УТВЕРЖДАЮ”
Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения
науки Института физиологии
растений им. К.А. Тимирязева РАН



_____ член-корр. РАН Вл.В. Кузнецов

“27” апреля 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертации

КУРБИДАЕВОЙ Амины Султановны
на тему «**Изучение роли гена *ICE2 Arabidopsis thaliana* в контроле устойчивости растений к холоду**», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Актуальность темы диссертационной работы

Механизмы контроля живых организмов на различные стрессы является предметом исследования во многих странах. Интерес к этим исследованиям основан на том, что такие механизмы важны для неподвижных организмов, поскольку этот тип организмов не способен выжить, если не их способность справиться с изменениями окружающей среды. Современные данные свидетельствуют о сложности ответных реакций организмов на стрессовые воздействия. Большой успех в области исследований стрессовых ответов на воздействие различных факторов достигнут с использованием совокупности классических и современных методов генетики, которые позволили идентифицировать многие гены, индуцирующиеся во время стрессов. Особое место в этом занимают работы по изучению генов, кодирующих транскрипционные факторы, поскольку они, с одной стороны, действуют на широкий круг генов-мишеней путем активации или репрессии, с другой, их действие достаточно

специфично и может являться основой для создания устойчивых к холоду хозяйственно ценных культур с использованием методов генетической инженерии. Несмотря на значительные успехи, наши познания механизма стрессового ответа на уровне целых организмов еще весьма ограничены. Так, исследование структуры ключевых генов, вовлеченных в ответ на стрессовые воздействия, роли таких генов в устойчивости растений к стрессовым факторам, а также сравнение внутри- и межвидового полиморфизма паралогичных генов и анализ возможных путей их эволюции, остаются первоочередными научными задачами. Исследования, направленные на выяснение физиологической роли определенных генов в механизмах стрессового ответа растений, важны как с фундаментальной точки зрения, так и с практической. Прежде всего, для создания полной картины молекулярно-генетических механизмов стрессовых ответов у растений и применения полученных знаний для биотехнологического использования. Диссертационная работа Курбидаевой Амины Султановны посвящена выяснению структуры гена *ICE2* и его роли в контроле устойчивости растений *A. thaliana* к холоду, сравнению внутри- и межвидового полиморфизма паралогов *ICE2* и *ICE1* и анализу возможных путей эволюции *ICE2*. **Актуальность этой работы не вызывает сомнения.**

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа, в целом, написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, а также приложения.

После краткого введения, в котором определены цель и задачи исследования, проведен анализ литературных источников, которые имеют непосредственное отношение к изучаемой проблеме. Обзор литературы охватывает широкий круг проблем и включает 5 разделов.

В первом разделе соискатель излагает современные данные о воздействии низких температур на растение – описание физиологических изменений, которые отмечаются в растительной клетке и в ее компартментах при действии температурного стресса. На основе анализа современных литературных данных соискатель в следующем разделе приводит общие данные об ответах растений на холод, выделяя три ключевых клеточных стратегий ответа – (1) стратегия, основанная на переживании низких температур за счет образования семян, корневищ, (2) стратегия, основанная на изменении пула специфических белков и вторичных соединений, (3) стратегия, основанная на изменении уровня экспрессии генов. Последняя стратегия включает три этапа: восприятие и передача сигнала, транскрипционный контроль, физиологические изменения, и в разделе дается описание каждого из них, отмечает ключевые участники, более подробно характеризуя транскрипционные факторы, регулирующие ответ на холод, а также последующие физиологические изменения в растительной клетке. Помимо этого, в одном из подразделов диссертант более подробно описывает роль абсцизовой кислоты, но при этом не оставляет без внимания и другие растительные гормоны и метаболиты, включая анализ литературных источников о взаимосвязи между регуляцией ответа на холод и времени зацветания. Следующая часть обзора литературы посвящена семейству белков ICE, в которой представлены современные данные о структурных особенностях белков этого семейства, об охарактеризованных доменах, а также о функции белков этого семейства, включая их роль в ответе на холод и механизмы регуляции, в том числе и на пост-трансляционном уровне, особо отмечая их участие в контроле развития устьиц. В заключительном разделе «Обзора литературы» приводится обоснование необходимости изучения природного разнообразия растений и достаточно подробно описаны генетические ресурсы *A. thaliana*. Дополнительно соискатель кратко описывает подходы, используемые для изучения адаптаций растений к климату, а именно, эко-

логический, генетический, основанный на картировании локусов, генов и нуклеотидов количественных признаков (QTL/QTG/QTN mapping), а также детекции действия отбора на ген методами популяционной и эволюционной генетики. Особое внимание в разделе уделено современному освещению вопросов внутривидового полиморфизма по устойчивости к холоду *A. thaliana* и его генетическим основам. Соискателем отмечена: клинальная изменчивость по устойчивости к холоду, роль генов регулона CBF в формировании внутривидовых различий по устойчивости к холоду *A. thaliana*, а также дается описание подходов, используемых в таких исследованиях, включая картирование локусов количественных признаков (QTL), анализ экспрессии генов, контролирующих устойчивость к холоду и анализ действия отбора на гены устойчивости к холоду. В заключительном разделе соискатель на основании анализа литературных источников четко определяет насущные научные задачи в этой области исследований. Такой раздел в составе главы «Обзор литературы» является целесообразным, поскольку позволяет оценить, насколько соискатель знает научную проблему и какую цель, и основные задачи, предполагает решить в рамках диссертационной работы.

В целом, обзор литературы написан хорошим языком, современен и касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы. Весьма отрадно, что Амина Султановна при написании литературного обзора, использует не только научные результаты зарубежных коллег, но и хорошо знает и цитирует научные публикации российских исследователей. Следует отметить, что все литературные данные анализируются соискателем квалифицированно и подробно, поэтому цель и задачи, поставленные автором работы, звучат вполне убедительно.

Традиционно после обзора литературы приводится описание материалов и методов исследования. В этой главе соискателем детально изложены методические особенности и приемы работы. Использован целый арсенал современных методов, применяемых в мировой практике анализа структуры и экспрессии генов, включая многочисленные алгоритмы биоинформатики и web-ресурсы. Следует отметить вполне удовлетворительную разрешающую способность избранных для работы методов и в ряде случаев их успешную модификацию с учетом специфики проводимых исследований.

Аналитическое рассмотрение Главы "Результаты" позволяет заключить следующее: автором была предпринята серия экспериментов, спланированных на хорошем профессиональном уровне, которые позволили полностью решить поставленные в ходе работы задачи. Эта Глава включает восемь разделами, при этом некоторые из них представлены подразделами. Прежде всего, хотелось подчеркнуть, что проведенные диссертантом исследования базируются на анализе литературных данных, согласно которых делается заключение о том, что необходимы (1) точная оценка роли гена *ICE2* в ответе на холод, (2) определение других его потенциальных функций у растений и (3) ответ на вопрос, какие эволюционные процессы привели к возникновению и специализации гена. В связи с этим фактом, соискатель выбирает стратегию исследования, основанную на использовании трансгенных растений, экспрессирующих этот ген, а также природных рас *A. thaliana* и последовательностей гомологов гена из других видов растений. Для этого, Амина Султановна первоначально анализирует филогению гена *ICE2*. В результате проведенных работ, соискатель получает убедительное подтверждение, что установленная дупликация генов *ICE* предположительно произошла уже после выделения Капустных в самостоятельную группу, но не в ходе полногеномной дупликации и это было подтверждено геномной микросинтением участков хромосом 1 и 3 *A. thaliana*, в которых локализованы гены *ICE2* и *ICE1*, соответственно.

Дальнейшие усилия соискателя направлены на то, чтобы выяснить какие структурные особенности имеют гены *ICE1* и *ICE2*, а также их белковые продукты. Результат этих исследований позволил диссертанту установить, что структура гомологов консервативна, однако белок *ICE2* приобрел новые домены со времени дивергенции этих генов, предположительно влияющих на вторичную структуру белка и его заряд. Дополнительно, на основе *in silico* анализа Амина Султановна получает данные, которые свидетельствуют о том, что белок *ICE2* находится под строгим посттрансляционным контролем. Далее, соискателем проведена детальная оценка промоторных областей генов *ICE1* и *ICE2*, а также сравнение характера их экспрессии. Совокупность полученных результатов и их аналитическое рассмотрение позволило Амине Султановне сделать обоснованное заключение, что регуляторная и кодирующая области гена *ICE2* *A. thaliana* значительно отличаются от гена *ICE1*, и это обуславливает особенности экспрессии гена *ICE2*, а также появление новых консервативных доменов в белковом продукте этого гена.

Весьма интересные результаты получены диссертантом при анализе полиморфизма нуклеотидных последовательностей генов *ICE1* и *ICE2* среди рас *A. thaliana* из разных широт. Целесообразность такого анализа продиктована возможной связью внутривидового полиморфизма генов *ICE1* и *ICE2* с экологически значимой фенотипической вариабельностью растений по устойчивости к холоду, обусловленной географическим происхождением. Результаты проведенного анализа позволили Амине Султановне выявить клинальную изменчивость по уровню внутривидового нуклеотидного полиморфизма только гена *ICE2*, но не *ICE1*. А именно, установить, что последовательность гена из растений южных рас по сравнению с северными расами *A. thaliana* испытывала пониженное давление стабилизирующего отбора.

Для того, чтобы выяснить какую физиологическую роль играет ген *ICE2* в жизнедеятельности растений, в том числе и при действии гипертермии, был проведен сравнительный анализ контрольных и трансгенных растений, экспрессирующих ген *ICE2*. В этом же разделе соискатель проводит обширные экспериментальные исследования и получает результаты, подтверждающие, что ген *ICE2* участвует в адаптации растений к холоду путем регуляции экспрессии генов регулона CBF (*CBF1*, *CBF3*, *COR15a*, *COR47*, *COR78*), а также генов ответа на холод, регулируемых абсцизовой кислотой (*RD29B*, *RAB18*, *ADH*).

Несмотря на то, что основная цель диссертационной работы - изучить структуру гена *ICE2* и его роль в контроле устойчивости растений *A. thaliana* к холоду, сравнить внутри- и межвидовой полиморфизм паралога *ICE2* и *ICE1* и провести анализ возможных путей эволюции *ICE2* - практически достигнута, соискатель задается вполне справедливым вопросом - участвует ли ген *ICE2* в механизмах адаптации *A. thaliana* к различным климатическим условиям? Для ответа на этот вопрос проводится сравнительный анализ северных рас *A. thaliana* и рас Dj-M (Франция) и Cvi-0 с тропических Островов Зеленого Мыса по оценки относительной экспрессии генов двух основных пути ответа растений на холодовой стресс: АБК-зависимого и АБК-независимого пути. Полученные соискателем результаты вместе с данными по клинальной изменчивости гена *ICE2* позволили высказать вполне убедительное предположение о том, что в условиях северного ареала ген *ICE2* играет более важную роль в контроле адаптации растений *A. thaliana* к холоду по сравнению с *ICE1*. Помимо этого, на основании известных фактов того, что (1) устойчивые к холоду трансгенные линии и расы из северных областей зацветают позднее, чем линии дикого типа из умеренной зоны, а также (2) что гены *SOC1*, *CBF1-3* и *FLC* опосредуют связь регуляции времени зацветания и ответа на холод, Аминой Султановной Курбидаевой изучена экспрессия генов цветения в позно- и ранозацветающих природных популяциях *A. thaliana* и трансгенных линиях растений с конститутивной экс-

прессией гена *ICE2*. Полученные результаты позволили соискателю предположить возможное участие *ICE2* в негативной регуляции перехода растений на репродуктивную стадию развития в условиях северного ареала. В разделе «Заключение», диссертант кратко суммирует полученные результаты.

Оценка оформления диссертационной работы

Диссертационная работа А.С. Курбидаевой, в целом, написана хорошим профессиональным языком, все экспериментальные данные сведены в таблицы и рисунки, а также представлены в разделе Приложение.

Степень новизны результатов научных исследований.

Соискателем впервые установлено, что ген *ICE2 Arabidopsis thaliana* способствует развитию устойчивости к холоду специфически в меристемах, и происходит это за счет регуляции различных путей ответа на холод - как СВФ-зависимой, так и связанной с повышенным синтезом АБК. Проведенные исследования впервые позволили получить убедительные данные о связи между уровнем полиморфизма гена *ICE2* и климатической изменчивостью к холоду северных и южных рас *A.thaliana*. Дополнительно, в диссертационной работе соискателем впервые изучена эволюция генов *ICE1* и *ICE2*, а также внутривидовой и межвидовой полиморфизм по этим генам.

Научная и практическая значимость результатов

Диссертационная работа Амины Султановны Курбидаевой совмещает в себе и фундаментальность, и практическую значимость. Полученные соискателем результаты важны для развития фундаментальных представлений о молекулярно-генетических механизмах функционирования генов растений, а также для понимания путей эволюции генов и таксонов, расширяют представления о микроэволюции генов после дупликации в свете адаптаций к климату, указывают на потенциальную роль регуляторных генов как основы адаптивного фенотипического разнообразия в природе. С практической точки данная работа интересна тем, что за счет переноса и экспрессии в растениях функционально активных аллелей *ICE2* возможно конструирование трансгенных форм хозяйственно важных видов Капустных, устойчивых к гипотермии.

Обоснованность и вероятность заключительных выводов и рекомендации

Использование для исследований репрезентативной выборки образцов, применение классических и современных молекулярно-биологических и генетических методов и методов анализа экспериментального материала подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе А.С. Курбидаевой, а также выносимых на защиту выводов и положений.

Результаты диссертации рекомендуются для использования в научно-исследовательских учреждениях биологического и образовательного профиля, занимающихся изучением молекулярных механизмов стрессового ответа растений для фундаментальных и практических исследований с получением коммерческой прибыли, а также и в преподавательском процессе при чтении спецкурсов по генетике, биотехнологии молекулярной биологии и физиологии растений.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты исследований по диссертации А.С. Курбидаевой опубликованы в 15 работах (в том числе 4 статьях в журналах, рекомендованных ВАК). Результаты исследований апробированы на Российских и Международных конференциях. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

При аналитическом рассмотрении представленных в диссертационной работе материалов возникают два вопроса.

- Во-первых, как конститутивная экспрессия дополнительной копии гена *ICE2* в трансгенных растениях сказывается на активации или подавлении экспрессии других генов, вовлеченных в ответные реакции растений. А именно, в диссертации соискатель не поясняет, чем же может быть обусловлено изменение экспрессии генов двух основных путей ответа растений на холодовой стресс: АБК-зависимого и АБК-независимого пути, т.е. данные «0» точки? Хотя, на наш взгляд, это целесообразно было пояснить, поскольку в трансгенных линиях уровень экспрессии гена *ICE2* значительно увеличился, и «0» точка является показателем того, как экспрессия гена *ICE2* сказывается на активации или подавлении экспрессии других генов, вовлеченных в ответные реакции растений. Таким образом, эти результаты, полученные соискателем, остались без обсуждения и пояснения.

- Во-вторых, вопрос, связанный с привлечением разных линий трансгенных растений в разных экспериментальных работах. Как пример, рисунок 18 – данные по сравнению показателей у контрольных растений и только линии D14 трансгенных растений, рисунок 21 – данные по сравнению показателей у контрольных растений и только линии D7 трансгенных растений. Это осталось в работе без пояснения и обсуждения полученных результатов.

По некоторым разделам диссертационной работе Амины Султановны Курбидаевой имеются некоторые замечания.

Принципиальных замечаний по разделу «Материалы и методы» нет, однако есть ряд вопросов и пожеланий, которые могут быть учтены в дальнейших работах соискателя.

- Замечания редакционного характера: (1) обозначения промотора 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (35S CaMV), который корректно обозначать как 35S PНК CaMV; (2) к термину «сайт начала трансляции», видимо автор имеет в виду стартовый AUG кодон.
- В таблице 6 – представлены данные о % сходства последовательностей генов *ICE1* и *ICE2* с генами расы Col-0, поэтому возникает вопрос – представлены данные об идентичности (Identity) или подобии (Similarity)? Если бы соискатель указал и англоязычную версию термина, вопроса бы не возникло.

По разделу «Результаты» имеется ряд замечаний и пожеланий:

- По нашему мнению, целесообразно было бы указать об отсутствии экспрессии у ряда генов метаболизма АБК и АБК-зависимых генов устойчивости (*ABA1*, *CYP707A2* и *ADH*) в линии D14. Соискатель лишь отмечает, что «экспрессия гена *ABA1* повышалась незначительно в листьях и меристемах. «Экспрессия гена *CYP707A2* повышалась в меристемах трансгенных растений и ДТ, в листьях линии D7 наблюдалась наибольшая активация» (но результаты по линии D14 не упоминаются) а также ... «экспрессия гена *ADH* повышается значительно в листьях и меристемах после 24 часов воздействия. В трансгенных растениях уровень транскрипции выше, чем в ДТ. Наиболее значительная индукция (в 4000 раз) наблюдалась в меристемах растений линии D7» (данные для линии D14 – не указаны). Хотя у линии D14 большой уровень экспрессии гетерологичного гена *ICE2*, вероятно, это негативно сказывается на экспрессии исследуемых генов. Эти результаты остались без должного внимания и пояснения в диссертационной работе.
- Целесообразно, на наш взгляд, было бы представить в разделе 3.6. данные по уровню экспрессии эндогенного гена *ICE2* у контрольных и трансгенных линий растений при действии низких температур. Эти результаты были бы полезны при обсуждении результатов по регуляции экспрессии генов регулона CBF и генов ответа на холод, регулируемых абсцизовой кислотой.

Все замечания к работе исчерпываются выше названными, большинство из которых, видимо, следует отнести к разряду досадных неточностей в оформлении работы. Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной работы, выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне, и оставляющей только хорошее впечатление.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Результаты представленной к защите диссертации свидетельствуют о высокой квалификации ее автора – А.С. Курбидаевой. Возвращаясь к несомненным достоинствам диссертации, следует подчеркнуть, что автором проделана большая и полезная работа. Составные части исследования осуществлены и изложены в последовательности, отражающей логику реализации конечной цели всей работы – изучить структуру гена *ICE2* и его роль в контроле устойчивости растений *A.thaliana* к холоду, сравнить внутри- и межвидовой полиморфизм паралога *ICE2* и *ICE1* и провести анализ возможных путей эволюции *ICE2*. Диссертантом использованы для исследований современные и классические методы молекулярно-генетического анализа. А.С. Курбидаева в достаточной степени эрудированна, хорошо знакома с литературой по теме диссертации. Список использованной литературы составляет 164 работы, большинство из которых на английском языке. Следует отметить правильность выбранной стратегии исследования и высокую квалификацию исполнения, что положительно характеризует самого исследователя, а также, безусловно, свидетельствует о высоком уровне исследований научного подразделения, в котором выполнялась данная работа. Все выше изложенное свидетельствует о соответствии соискателя А.С. Курбидаевой ученой степени, на которую она претендует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Курбидаевой Амины Султановны на тему «**Изучение роли гена *ICE2 Arabidopsis thaliana* в контроле устойчивости растений к холоду**» является законченной научно-исследовательской работой, имеющей научно-практическое значение для решения вопросов в области генетики растений. По актуальности темы, новизне результатов, теоретической и практической значимости результатов диссертационная работа соответствует пункту 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Считаем, что автор Курбидаева Амина Султановна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Отзыв обсужден на заседании Межлабораторного семинара, при участии сотрудников Лаборатории молекулярных основ внутриклеточной регуляции, Лаборатории управляемого биосинтеза и группы функциональной геномики Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (Протокол № 04\15 от “15” апреля 2015 г.).

Руководитель группы функциональной геномики,
Ведущий научный сотрудник Института физиологии растений
им К.А. Тимирязева РАН,
доктор биологический наук, доцент



И.В. Голденкова-Павлова

27 апреля 2015 года