

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.2.479.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«УФИМСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ НАУКИ И ТЕХНОЛОГИЙ»
МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 21 декабря 2023 г. № 5

О присуждении Таиповой Рагиде Мухтаровне, гражданке РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Физиолого-биохимическая характеристика генетически трансформированных и мутантных форм *Amaranthus spp*» по научной специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений принята к защите 19 октября 2023 года (протокол № 2) диссертационным советом 24.2.479.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уфимский университет науки и технологий» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32), приказ № 493/нк от 22.03.2023 г.

Соискатель, Таипова Рагида Мухтаровна, 15 июня 1995 года рождения. В 2019 г. окончила магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный университет» по направлению подготовки 06.04.01 Биология, профиль Биохимия и молекулярная биология. В 2023 году окончила аспирантуру по очной форме обучения Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уфимский

университет науки и технологий» по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль: Физиология и биохимия растений). Работает в должности ассистента на кафедре биохимии и биотехнологии Института природы и человека Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уфимский университет науки и технологий» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Диссертация выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии Института природы и человека Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уфимский университет науки и технологий» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель – Кулуев Булат Разяпович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией геномики растений Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

1. Соловьев Александр Александрович - доктор биологических наук (03.00.15 – генетика, 06.01.05 – Селекция и семеноводство), профессор, профессор РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений», заместитель директора;

2. Ермошин Александр Анатольевич - кандидат биологических наук (03.01.05 – Физиология и биохимия растений), доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, доцент кафедры экспериментальной биологии и биотехнологий Института естественных наук и математики

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток, в своем положительном отзыве, подписанном Шкрылем Юрием Николаевичем – кандидатом биологических наук, доцентом, ведущим научным сотрудником лаборатории бионанотехнологий и биомедицины Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН и утвержденном директором Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, д.б.н., чл.-корр. РАН Гончаровым А.А., указала, что в диссертационной работе Р.М. Таиповой был применен широкий спектр современных и методов, обеспечивающих исследование физиолого-биохимической характеристики генетически трансформированных и мутантных форм амаранта. Применение химического мутагенеза, современных приемов генетической инженерии растений, молекулярно-генетического и биохимического анализа подчеркивает комплексность проведенного исследования. Для реализации данной работы привлекалась приборная база: для молекулярно-генетического анализа использовали амплификатор, для разделения нуклеиновых кислот использовали электрофоретические камеры, определение активности антиоксидантных ферментов выполнялось с использованием спектрофотометра, а анализ липидов и жирных кислот был выполнен с помощью хроматографа. Методы, используемые для достижения поставленной цели, полностью соответствуют поставленным задачам. Результаты представлены в детальной и всесторонней манере, демонстрируя значимые научные и практические достижения. Автор дополняет каждый раздел результатов собственным заключением, в котором проводится анализ полученных данных. Сделанные выводы ясно сформулированы и напрямую соответствуют поставленным исследовательским задачам.

В целом, диссертация Р.М. Таиповой является результатом продолжительной работы, выполненной с высоким уровнем

профессионализма и компетентности. Исследование характеризуется логически выстроенной структурой и является законченным научным трудом, отражающим глубокое понимание исследуемой темы и отвечает требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 в действующей редакции, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений.

Соискатель имеет 7 научных статей, из них 3 научные работы в журналах, рекомендованных перечнем ВАК РФ при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, а также 3 научные статьи в изданиях, включенных в базы данных Scopus или RSCI и 1 научная публикация, в журнале индексируемом в базе данных РИНЦ.

Общий объем публикаций по теме диссертации 4,6 п.л., авторский вклад – 1,6 п.л. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах.

Научные работы по теме диссертации:

1. Таипова Р.М., Кулуев Б.Р. Введение в культуру *in vitro* и регенерация побегов из эксплантов эпикотилей амаранта *Amaranthus cruentus* // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. - 2018. - Т. 14, № 1. - С. 64-66.

2. Таипова Р.М., Кулуев Б.Р. Определение оптимальной концентрации мутагена азидата натрия для обработки семян *Amaranthus cruentus* L. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. - 2021. - № 3. - С. 34-41.

3. Таипова Р.М., Мусин Х.Г., Гайнуллина К.П., Кулуев Б.Р. Оценка генетического разнообразия и устойчивости мутантов *Amaranthus cruentus* L. к засухе и засолению // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. - 2023. - № 2. С. 77-93.

4. Кулуев Б. Р., Михайлова Е. В., Таипова Р.М., Чемерис А. В. Изменение фенотипа трансгенных растений амаранта *Amaranthus retroflexus* L. с конститутивной экспрессией гена *ARGOS-LIKE* // Генетика. - 2016. - Т. 52, № 12. - С. 1388-1397.

5. Таипова Р.М., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Агробактериальная трансформация эксплантов эпикотилей амаранта багряного *Amaranthus cruentus* // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. - 2020. - Т. 13, № 2. - С. 179-187.

6. Таипова Р.М., Нестеров В.Н., Розенцвет О.А., Кулуев Б.Р. Изменения в содержании белков, липидов и состоянии антиоксидантной системы у мутантных форм амаранта *Amaranthus cruentus* L. // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. - 2021. - № 1. - С. 76-85.

7. Таипова Р.М., Кулуев Б.Р. Амарант: особенности культуры, применение, перспективы возделывания в России и создания трансгенных отечественных сортов. Биомика. - 2015. - Т. 7, № 4. – С. 284-299.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток. Отзыв положительный. Имеются замечания: 1. В литературном обзоре автор описывает преимущества амаранта как сельскохозяйственной культуры, его высокую питательную ценность и устойчивость к стрессовым факторам. Но при этом не упоминается, с какими трудностями сталкиваются сельскохозяйственные предприятия при культивации амаранта и какие проблемы необходимо решить для более успешного выращивания амаранта в России. Это добавило бы целостности исследованию и помогло бы лучше понять потенциал амаранта в российском агропромышленном контексте. 2. В литературном обзоре отсутствуют иллюстрации, которые могли бы повысить наглядность этого раздела диссертации. Например, на стр. 31 было бы уместно привести структуру

исследуемого белка ARL с указанием функциональных доменов. Кроме того, информация об отечественных сортах амаранта на стр. 15–18 была бы гораздо информативнее в форме таблицы. 3. В разделе материалы и методы не представлено подробное описание условий проведения экспериментов по созданию стрессовых условий, таких как воздействие засухи и засоления. Также не описаны условия проведения качественного ОТ-ПЦР анализа. Это затрудняет понимание и сравнение результатов. 4. На стр. 46 и 50 неясно, почему для генетической трансформации *A. retroflexus* была использована одна экспрессионная кассета (с промотором вируса мозаики георгина), а для *A. cruentus* – другая (с промотором вируса мозаики цветной капусты). Был ли проведен сравнительный анализ их эффективности для гетерологичной экспрессии гена *ARGOS-LIKE* в двух разновидностях амаранта? 5. Стр. 59. С чем может быть связана низкая всхожесть семян после обработки фосфатным буфером? Каков процент всхожести у *A. cruentus* без какой-либо обработки? 6. В таблице 3 заметна отрицательная корреляция между концентрацией азидата натрия и высотой стебля мутантных растений в диапазоне 0,1-5 мМ. Однако при высоких концентрациях (20 и 40 мМ) наблюдается заметное увеличение данного показателя. Как автор может объяснить этот необычный эффект? 7. Стр. 76. Для анализа антиоксидантного статуса мутантных линий были выбраны растения с максимальным содержанием белка в семенах. Почему на выбор автора повлияло именно содержание белка, а не содержание липидов или другие характеристики мутантных линий? 8. Стр. 76 и 81. Почему в качестве стресс-факторов были выбраны засуха и засоление? Исходя из литературного обзора амарант от природы довольно устойчив к этим воздействиям. Не более актуальны ли сорта, устойчивые к холоду? 9. На рис. 94 приведены морфометрические показатели (высота стебля и длина листьев) трансгенных по гену *ARL* растений *A. retroflexus*. Можно ли сравнить их с соответствующими характеристиками мутантных растений *A. cruentus*? Какой из подходов, селекция мутантных форм или трансгенез, по мнению автора более перспективен? 10. Эффективность агробактериальной трансформации

эпикотелей оказалась в три раза выше метода погружения цветков. Однако в первом случае результатом трудоемких усилий стали только 3 трансгена, тогда как в методе *in vivo* было получено 26 растений. Означает ли это, что метод трансформации *in vitro* не подходит для амаранта, или, по мнению автора, существуют случаи, когда его применение все же целесообразно?

2. Официального оппонента, доктора биологических наук, профессора, профессора РАН, заместителя директора Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр карантина растений» Соловьева Александра Александровича. Отзыв положительный. Имеются замечания: 1. В обзоре литературы не хватает сравнительной характеристики использованных видов амаранта. 2. Поколения трансгенных растений обозначаются буквой «Т», а не «М», как указано на стр. 29. 3. Описание материала, использованного в работе, представлено хаотично. Хотелось бы уточнить происхождение всех образцов, использованных в работе. Почему использован сорт Багряный, который не внесен в реестр Госсортокмиссии? 4. Каким образом отбирали «3 крупных» листа для морфометрического анализа? 5. К сожалению, отсутствует информация о растениях М0-поколения в результате химического мутагенеза. 6. Хотелось бы прояснить каким образом, на основании каких признаков, в каком количестве отбирались мутантные растения в поколениях М1-М2? Чем обусловлено, что для изучения использовано лишь по одной мутантной линии из каждого варианта обработки мутагеном? 7. Имеются ли данные об изменении/сохранении биохимических показателей в ряду мутантных поколений? 8. Чем обусловлен выбор сорного вида *Amaranthus retroflexus* для генетической трансформации? 9. О каких поколениях – Т2 или Т3 идет речь на стр. 91 и 92 в отношении полученных 26 растениях?

3. Официального оппонента, кандидата биологических наук, доцента, доцента кафедры экспериментальной биологии и биотехнологий Института естественных наук и математики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Уральский

федеральный университет им. первого Президента Б.Н. Ельцина Ермошина Александра Анатольевича. Отзыв положительный. Имеются замечания: 1. Во введении сказано, что зерно амаранта содержит 12 – 18% белка, однако в собственных результатах автора содержание белка составляло всего 0,9 – 1,2%. Чем обусловлена такая разница между собственными результатами и литературными данными? 2. Растения, полученные из семян, обработанных азидом натрия – это поколение M_0 или M_1 ? – В работе нет пояснений по этому поводу, но идет речь об экспериментах на M_2 и M_3 , не совсем ясно, от каких растений получены эти поколения. 3. Какие морфологические характеристики имели растения мутантной линии б? – данная линия исследовалась на содержание белка в семенах, устойчивость к стрессорам, проводилась её оценка с помощью генетических маркеров, однако она отсутствует на рисунке 2 с. 63. 4. Была проведена оценка массы 1000 семян у мутантных растений амаранта и дикого типа. Проводилась ли оценка общей продуктивности мутантных линий? Какой урожай давали они, в сравнении с контролем? 5. Почему для искусственного мутагенеза и генетической трансформации использовали разные виды амаранта? Чем обусловлен выбор данных видов? 6. Почему при оценке размеров листьев не был учтен ярус, на котором располагались листья? 7. Каждой концентрацией азидом натрия обрабатывали 100 семян. Часть из них проросла. Очевидно, что в каждом индивидуальном растении, из опытной группы, произошли свои мутации. Не было бы более корректным называть отдельной линией каждый проросток, после обработки азидом натрия, а не объединять их? (т. е. вместо линии 1 были получены линии 1-1, 1-2 и т.д.). Также отмечены некоторые неточности в оформлении рукописи, например: 1. в методах, в разделах 2.8. и 2.17. упоминается стресс, но нет отдельного раздела, описывающего дизайн эксперимента по стрессовому воздействию; 2. не все сокращения вынесены в список, некоторые сокращения в тексте появляются раньше, чем первое полное упоминание термина; 3. в главе «материалы и методы» не указана модель и марка спектрофотометра, на котором производились измерения. У хроматографа не

указан тип детектора; 4. на рисунке 6 б (с 79) неправильно подписана ось – указаны см, вместо см²; 5. в табл. 6 (с. 72) указано «жирным обозначены результаты, достоверно превышающие показатели контроля», хотя часто в данных наблюдается достоверное снижение, относительно контроля, например для стеариновой и олеиновой кислот; 6. на фотографиях растений и эксплантов отсутствуют масштабные линейки.

4. Кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории биотехнологии растений Южно-Уральского ботанического сада-института Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук Зариповой Альфии Ануровны. Отзыв положительный. Вопросов и замечаний нет.

5. Кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории генной инженерии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» Железниченко Татьяны Витальевны. Отзыв положительный. Вопросов и замечаний нет.

6. Кандидата биологических наук, заведующего кафедрой биохимии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» Брилкиной Анны Александровны. Отзыв положительный. Вопросов и замечаний нет.

7. Кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории физиологической генетики Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук Павличенко Василия Валерьевича. Отзыв положительный. Имеются замечания: при первом упоминании объекта исследования следует давать его полное название – *Amaranthus cruentus* L. Формулировки пунктов 1, 4,5, в разделе «новизна» не совсем удачны и не отражают уникальность

проделанной работы. Автору следует более акцентированно описывать новизну своей работы. При описании методики стерилизации семян автор не приводит временные параметры. На электрофореграммах результатов ПЦР не приведены положительный и отрицательный контроли ПЦР. Проводились ли они автором? В работе приводились испытания трансгенных растений на опытном участке, но ничего не сказано о его характеристиках, степенях его защиты и условиях соблюдения законодательства РФ в области регулирования генно-инженерной деятельности. Почему в качестве маркерного гена автором был использован репортерный ген *uidA* GUS-репортерной системы? Автор отмечает, что у мутантных линий был обнаружен фосфатидилглицерол, тогда как у контроля он не выявлялся. Как это можно объяснить? В тексте автореферата присутствуют опечатки, стилистические неточности и пунктуационные ошибки.

8. Доктора биологических наук, доцента, руководителя лаборатории функциональной геномики, ведущего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук Голденковой-Павловой Ирины Васильевны. Отзыв положительный. Имеются замечания: 1. Соискатель использовал ген, обеспечивающий устойчивость к гигромицину как селективному агенту. На основании каких данных (собственные предварительные исследования или литературные данные) использован именно этот ген для отбора первичных трансформантов амаранта и была ли предварительно подобрана используемая концентрация селективного агента для отбора или автор руководствовался литературными данными?

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их высокой профессиональной квалификацией, наличием публикаций по проблематике, связанной с темой диссертации, компетенциями в вопросах, имеющих отношение к теме работы. Ведущая организация и оппоненты не имеют совместных проектов и публикаций с соискателем.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Научная новизна работы заключается в следующем:

- Проведены работы по определению оптимальной концентрации мутагена для обработки семян амаранта *A. cruentus*, которая оказалась в диапазоне 0.5-1 мМ, результаты данного исследования в дальнейшем позволяют проводить работы по увеличению генетической изменчивости амаранта;

- Проведен химический мутагенез амаранта *A. cruentus* с помощью азид натрия, что позволило получить новые мутантные формы амаранта, характеризующиеся достоверным увеличением содержания линолевой и пальмитиновой кислот и высоким содержанием общего растворимого белка, на 52% выше по сравнению с исходным типом.

- Созданы солеустойчивые и засухоустойчивые линии амаранта методом химического мутагенеза, которые могут быть использованы в селекции амаранта с целью получения его новых стрессоустойчивых сортов;

- Получены методом погружения цветков генетически трансформированные растения амаранта *A. Retroflexus* со сверхэкспрессией гена *ARGOS-LIKE*, характеризующиеся увеличением размеров листьев и стебля по сравнению с исходным типом, что позволяет использовать примененную методику и выбранный целевой ген для изменения морфометрических показателей растений амаранта;

- Разработана технология создания трансгенных растений *A. cruentus* путем сокультивации сегментов эпикотилей с *A. tumefaciens* в условиях *in vitro*, что позволяет эффективно использовать данную методику для получения генно-модифицированных растений амаранта.

Теоретическая и практическая значимость результатов заключается в том, что полученные в ходе работы трансгенные и мутантные линии амаранта могут эффективно применяться в дальнейшей селекции с целью выведения новых сортов этой культуры с увеличенными размерами надземных органов.

Разработанные методы генетической трансформации *A. retroflexus* и *A. cruentus* могут быть использованы в генной инженерии и геномном редактировании данных видов амаранта. Разработанный метод обработки семян амаранта азидом натрия может быть использована при химическом мутагенезе амаранта для увеличения содержания линолевой и пальмитиновой кислот и повышения содержания общего растворимого белка. Основные результаты исследований могут быть использованы при проведении лабораторных занятий по дисциплинам «Основы генной инженерии» и «Биотехнология растений» и ценность научных работ заключается в разработке метода индуцированного мутагенеза *A. cruentus* с помощью азида натрия, а также метода генетической трансформации *A. cruentus* путем сокультивации сегментов эпикотилей с *A. tumefaciens* в условиях *in vitro* и разработке технология генетической трансформации *A. retroflexus* методом *floral dip*.

Достоверность полученных результатов и выводов обеспечивается применением современных методов физиологии, биохимии, генетики и молекулярной биологии растений, соответствующего оборудования, высококачественных реактивов, а также достаточной выборкой и большим объемом проведенной работы. Для интерпретации и анализа полученных результатов привлечено достаточное количество данных литературы. Выводы объективно и полноценно отражают результаты проведенных исследований. Результаты исследования соответствуют данным, представленным в отечественной и зарубежной литературе. Проведенный статистический анализ подтверждает достоверность полученных результатов.

Личный вклад автора в проведенные исследования.

Определение направления диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научным руководителем д.б.н. Кулуевым Б.Р. Автором самостоятельно обобщена отечественная и зарубежная литература по теме диссертации и лично написана рукопись данной работы. Автор непосредственно участвовал в подготовке материалов к

д.б.н. Кулуевым Б.Р. Автором самостоятельно обобщена отечественная и зарубежная литература по теме диссертации и лично написана рукопись данной работы. Автор непосредственно участвовал в подготовке материалов к публикациям по диссертационной теме и их написании. Основная часть экспериментальной работы выполнена автором самостоятельно.

В ходе защиты диссертации было высказано критическое замечание, касающееся определения фенотипа растений и его исходных форм. Сделано пожелание в дальнейшей работе учитывать показатели, связанные с физиолого-биохимическими реакциями растений на факторы среды, например, засухоустойчивость. Соискатель Таипова Р.М. согласилась с высказанным замечанием.

На заседании 21.12.2023 г. диссертационный совет принял решение за научное достижение, заключающееся в решении научной задачи, имеющей существенное значение для понимания физиолого-биохимических характеристик растений амаранта на примере нескольких видов, в том числе трансформированных с помощью технологий химического мутагенеза и генетической трансформации, в нормальных и стрессовых условиях, присудить Таиповой Рагиде Мухтаровне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 12 человек, из них 6 докторов биологических наук по научной специальности, участвовавших в заседании, из 18 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали: за – 12, против – 0, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель
диссертационного совета



Фархутдинов Рашит Габдулхаевич

Ученый секретарь
диссертационного совета

Григориади Анна Сергеевна

21 декабря 2023 г.