

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Таиповой Рагиды Мухтаровны, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук, на тему: «Физиолого-биохимическая характеристика генетически трансформированных и мутантных форм *Amaranthus spp*», по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений

Актуальность темы диссертационной работы

Работа посвящена актуальной задаче - селекции растений амаранта, направленной на повышение устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды и повышение качества урожая.

Амарант – в значительной степени новая кормовая, зерновая и декоративная культура для нашей страны. Преимущества амаранта, в сравнении с традиционными культурами – высокое содержание, сбалансированного по аминокислотному составу, белка в семенах; высокая биологическая и сельскохозяйственная продуктивность, обусловленная C₄-типом фотосинтеза и подавленным фотодыханием данного вида.

Актуальными являются методические подходы, реализуемые в диссертации – зарекомендовавший себя в селекции метод химического мутагенеза, а также современный генноинженерный метод.

Научная новизна и практическая значимость результатов исследования

Проведен химический мутагенез амаранта *A. cruentus* с помощью азидата натрия. Подобраны оптимальные концентрации мутагена, позволившие получить высокий выход мутантов. Получены мутантные линии, обладающие комплексом улучшенных сельскохозяйственных признаков – большими размерами растений, устойчивостью к засолению и засухе, повышенным содержанием белка и улучшенным жирнокислотным составом семян.

Впервые получены трансгенные растения амаранта. Особенность работы, заключается в том, что были испытаны два метода - погружения цветков, что

позволяет исключить использование дорогостоящих фитогормонов, стерильных питательных сред, нивелировать соматическую вариабельность. Второй метод классический, предполагающий использование стерильных условий и этап каллусной культуры.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора научной литературы, описания материалов и методов исследования, главы с результатами и их обсуждением, раздела с выводами, списка цитируемой литературы.

Во введении автор дает обстоятельное обоснование актуальности исследования, кратко описывает особенности амаранта, как зерновой культуры, ставит цель исследования, подробно описывает задачи, позволяющие достигнуть цель. Затем автор дает обоснование научной новизны, теоретической и практической значимости исследования.

Обзор литературы можно разделить на две тематически связанные части. В первой дается характеристика амаранта, как новой сельскохозяйственной культуры. Дается общая характеристика рода, отмечается наличие C₄-типа фотосинтеза, как преимущества данного рода. Описываются сорта амаранта, входящие в реестр селекционных достижений РФ, дается классификация сортов, в зависимости от области их применения. В следующем параграфе подробно описываются питательные свойства семян амаранта – аминокислотный состав белка, состав жирных кислот масла амаранта. Указывается на возможность применения амаранта как компонента функционального питания – в амаранте обнаружены пептиды с противоопухолевой и противовоспалительной активностью, указывается на возможность применения семян амаранта для профилактики сахарного диабета и снижения уровня холестерина.

Вторая часть обзора посвящена обзору реакций амаранта на абиотический стресс, а также вовлеченности гена *AGROS LIKE* в регуляцию стрессоустойчивости. Из данной части обзора становится очевидным, что литературы о реакции растений амаранта на стрессовые воздействия, механизмы

устойчивости данных растений к неблагоприятным факторам внешней среды недостаточно.

В целом обзор литературы достаточно компактный, касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы.

В главе «Материалы и методы» дано детальное описание процедур, произведенных с экспериментальными растениями, однако не дано обоснование выбора сортов и видов амаранта, использованных в исследовании. Также пропущен раздел, касающийся дизайна эксперимента по солеустойчивой и засухоустойчивости.

В главе «Результаты и их обсуждение» можно также выделить две части – химический мутагенез и генетическая трансформация амаранта. Первая часть значительно больше и подробнее.

В начале главы подробно обосновывается рекомендуемая концентрация азиды натрия. Обсуждается как мутагенный, так и токсический эффект препарата. Обосновано рекомендуется для работы концентрация от 0,5 до 1 мкМ, которая позволяет выжить половине растений и при этом, дает высокий выход мутантов. Описывается любопытный феномен – растения поколения M_2 в начале развития отстают в росте от контрольной группы (табл. 2, с. 62), но начиная со 2 месяца достоверно превосходят контроль как по высоте, так и по размеру листьев (рис. 2., с. 63). К сожалению, в работе не обсуждается причина такого поведения мутантных растений.

Далее дается оценка генетического разнообразия полученных мутантных линий.

В следующем параграфе исследуются питательные свойства семян, полученных от мутантных линий амаранта. Изучается содержание белка, количество липидов и их состав. Отмечено, что все мутантные линии содержали достоверно больше белка, чем семена контрольных растений. Часть мутантных линий имело повышенное содержание липидов, что сопровождалось изменением их состава.

В параграфах 3.1.5. и 3.1.6. приведены данные об реакциях изучаемых растений на абиотические стрессоры – засуху и засоление. Выводы по этим

разделам могут являться поводом для дискуссии, так как не совсем понятно, как проводились сравнения растений в стрессе и без него. На рисунках варианты без стресса и в стрессе обозначены столбиками разного цвета. Одинаковые, статистические не различимые, варианты обозначены одной буквой. Но не понятно, эта буква относится ко всему рисунку или только к части растений. Например, на рис. 9 б (с. 83) мутант б в нормальных условиях и «дикий тип» в стрессе обозначены одинаково – «А», однако очевидно, что они различаются и должны маркироваться разными буквами. Такую же ситуацию можно видеть и на других рисунках. Таким образом, можно предположить, что достоверность отличий определяется только между вариантами «дикий тип – мутантная линия», на основании отличий в этой паре, в стрессовых условиях, делается вывод о большей устойчивости. Однако наличие стресса у растений нужно доказать, поэтому рациональнее было бы выявлять отличия для каждой мутантной линии в паре «контроль - стресс», например линия б – из текста работы следует, что она более устойчива к засолению, чем растения дикого типа (с. 82). В качестве аргумента приводится активность аскорбатпероксидазы, которая выше, чем у дикого типа (рис. 10 б). Но если сравнивать растения в контроле и опыте, то в ответ на стрессовое воздействие у мутантной линии б активность аскорбатпероксидазы не меняется (хотя на рисунке столбики промаркированы разными индексами).

Следующие разделы диссертации посвящены биотехнологии амаранта. В них автор разрабатывает собственные методики агробактериальной трансформации растений амаранта – метод погружения цветков и метод трансформации эксплантов в асептической культуре. После дается подробное доказательство трансгенной природы полученных линий растений, оценка частот трансформации и морфометрическая характеристика полученных линий.

Обоснованность и вероятность заключительных выводов

Использование классических и современных молекулярно-генетических, физиологических и биохимических методов, а также статистический анализ экспериментального материала подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работ, а

также выносимых на защиту положений и выводов. Дискуссию может вызвать вывод №3, относительно устойчивости мутантных форм – несомненно, реакция растений мутантных линий на абиотический стресс отличается от реакции растений дикого типа. Результаты представляют интерес, но вывод об устойчивости мутантов необходимо делать с осторожностью.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты исследований по диссертации Таиповой Р.М. опубликованы в 6 статьях в изданиях, рекомендованных ВАК или входящих в международную базу Scopus. 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 возник ряд вопросов:

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 6? – 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 азидо 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.)

В качестве замечаний следует отметить некоторые неточности в оформлении рукописи, например:

- в методах, в разделах 2.8. и 2.17. упоминается стресс, но нет отдельного раздела, описывающего дизайн эксперимента по стрессовому воздействию;
- не все сокращения вынесены в список, некоторые сокращения в тексте появляются раньше, чем первое полное упоминание термина;
- в главе «материалы и методы» не указана модель и марка спектрофотометра, на котором производились измерения. У хроматографа не указан тип детектора;
- на рисунке 6 б (с. 79) неправильно подписана ось – указаны см, вместо см²;
- 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;
- на фотографиях растений и эксплантов отсутствуют масштабные линейки.

В качестве рекомендации, стоит отметить, что если бы агробактериальная трансформация эксплантов и погружение цветков были выполнены на одном виде растений, а не на разных, то можно было бы сравнивать эффективность двух видов трансформации, что повысило бы ценность результатов.

Все замечания к работе исчерпываются выше названными, большинство из которых следует отнести к разряду досадных неточностей в оформлении работы. Высказанные замечания не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация на тему «Физиолого-биохимическая характеристика генетически трансформированных и мутантных форм *Amaranthus spp*» по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, и представляет собой законченную научно-квалификационную работу, а ее автор, Таипова Рагида Мухтаровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент, доцент 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», кандидат биологических наук по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений, доцент по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнология)

Ермошин Александр Анатольевич

«21» ноября 2023 года

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Уральский федеральный университет им. Первого Президента Б.Н. Ельцина», 620002, Свердловская область, г. Екатеринбург, ул. Мира, д. 19. Тел.: 8 (843) 389-97-28. Адрес электронной почты: Alexander.Ermoshin@urfu.ru

Я, Ермошин Александр Анатольевич, даю согласие на включение своих персональных данных в документы, связанные с работой диссертационного совета, и их дальнейшую обработку.

Подпись *Ермошин А.А.*
 Заверяю: вед. документовед
С.В. Мерлова