

**Отзыв официального оппонента Матвеевой Татьяны Валерьевны
на диссертацию Гуриной Алёны Алексеевны
“Полиморфизм R-генов у примитивных культурных видов секции *Petota Dumort.*
рода *Solanum L.*”, представленную на соискание степени
кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. - Генетика**

Актуальности избранной темы

Картофель является одной из ключевых сельскохозяйственных культур в нашей стране и за рубежом. К сожалению, эта культура страдает от вредителей и болезней различной природы, что может приводить к существенным потерям урожая. Ключевым фактором картофелеводства являются высокоурожайные, устойчивые к болезням и вредителям сорта, качество продукции которых соответствует требованиям потребителей. Поэтому вопрос интрогрессии генов устойчивости (*Resistance genes* или R-генов) из других видов весьма актуален. Дикие виды картофеля, помимо ценных признаков устойчивости, несут массу нежелательных свойств, как правило, связанных с высоким содержанием токсичных для человека метаболитов, а также плохо скрещиваются с *S. tuberosum L.* Примитивные культурные виды (ПКВ) картофеля, в том числе *S. phureja* Juz. et Buk., *S. stenotomum* Juz. et Buk., *S. goniocalyx* Juz. et Buk. и *S. × ajanhuiri* Juz. et Buk., легко скрещиваются с *S. tuberosum*, обладают устойчивостью к различным заболеваниям. Именно эти виды стали объектом исследования в рецензируемой работе. К сожалению, в отличие от некоторых диких видов, устойчивость не является преобладающей характеристикой всех образцов ПКВ картофеля. Поэтому оценка полиморфизма R-генов ПКВ картофеля является актуальной задачей.

Научная новизна

В диссертационной работе впервые проведена комплексная оценка образцов ПКВ картофеля из клоновой коллекции ВИР по различным признакам. Впервые описаны последовательности гомологов генов устойчивости к фитофторозу (*Rpi-R3b*, *Rpi-ber1*), вертициллёзному увяданию (*Ve1*, *Ve2*), цистообразующим нематодам (*Gro1-4*, *Gpa2*) и вирусу X (*Rx1*) у ПКВ картофеля и охарактеризован полиморфизм нуклеотидных последовательностей маркерных фрагментов некоторых из этих генов. Впервые показана неравномерная встречаемость замен в нуклеотидных последовательностях различных R-генов.

Значимость работы

Выявлены образцы клоновой коллекции ПКВ картофеля ВИР устойчивые к фитофторозу (*S. × ajanhuiri* – к-9900-138, к-9911-140; *S. goniocalyx* – к-9922-251, *S. phureja* – к-8873-249; к-9345-219, к-11547-227, к-16898-238, к-17618-293, к-19321-242, к-23516-189; *S. stenotomum* – к-11020-283, к-9278-273, к-17486-293, к-8354-268), и ЗКН (*S. goniocalyx* – к-11080-134 и *S. phureja* – к-8210-214, к-8497-217, к-8940-250, к-9402-225, к-17462-240, к-19198-201, к-24326-198, разработаны молекулярные маркеры к различным аллелям гена *Rpi-vnt1*.

Основное содержание

Диссертационная работа изложена на 147 страницах, содержит 12 таблиц, иллюстрирована 28 рисунками и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследований, результатов и обсуждения, заключения, списка использованной литературы, включающего 258 источников, в том числе 238 ссылок на иностранном языке, четырёх приложений.

В **обзоре литературы** автор знакомит читателя с примитивными культурными видами картофеля, очерчивает основные проблемы, стоящие перед генетиками, изучающими различные виды картофеля, освещает механизмы устойчивости растений к заболеваниям, останавливается на описании основных болезней картофеля и генах устойчивости к ним.

Общая структура обзора представляется достаточно удачной, но к этому разделу есть **замечания**.

1. Поскольку охват тем широк, трудно ожидать, что все читатели этого обзора будут одинаково хорошо ориентироваться, как в морфологии различных видов рода *Solanum*, так и в структуре рецепторов. Поэтому, отсутствие рисунков в тексте затрудняет восприятие информации. Приведу только один пример: на страницах 33-34 можно найти такие предложения “Домен TIR (Toll/interleukin-1 receptor) представляет собой консервативную флаводоксиподобную складку из пяти α -спиралей, окружающих β -лист (Ve et al., 2015). Они способны к самоорганизации, и при активации белка образуется тетрамерная структура из TNL, а TIR-домены формируют два димера, которые обладают NAD⁺-гидролазной активностью (Yu et al., 2022).” Человек со средним восприятием пространственных структур такое поймет далеко не сразу. Что способно к самоорганизации: спирали, домены, или

белки? Как соотносятся тетрамеры и димеры? Рисунок сильно бы упростил процесс восприятия этого текста.

2. Поскольку работа посвящена R-генам, в обзоре литературы хотелось бы видеть более подробную информацию о том, что уже известно о них и их аллельных состояниях. Однако, автор ограничивается буквально одним абзацем текста и одной таблицей, структура которой вызывает вопросы:

- у какого растения описаны упомянутые в таблице гены?
- гомологи обнаружены в том же геноме, что и ген из 2 столбца таблицы, или у близких родственников?
- насколько приемлем термин “тип гена”, не лучше ли классифицировать на семейства и подсемейства генов?
- почему ограничились только этим перечнем генов, если в статьях список шире? Например в работе Dubey с соавторами (2021, <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.791055>) у *S.tuberosum* выявлено 44 TIR-NBS-LRR (TNL) гена, семь из которых дифференциально экспрессировались при альтернариозе. Эти данные не отражены ни в таблице, ни в тексте главы. Забегая вперед, следует отметить, что даже в экспериментальной части работы исследовано больше генов (26), чем описано в обзоре литературы.

3. Автор небрежно обращается с терминами “ген” и “аллель”. На странице 45 можно увидеть такое высказывание: “Количество известных генов постоянно расширяется, но их вовлечение в селекционный процесс - отдельная трудоемкая задача, а постоянная изменчивость патогенов требует вливания новых генов устойчивости и создания сортов с несколькими генами устойчивости к одному патогену”. Вся дальнейшая работа посвящена изучению полиморфизма R-генов. Очевидно, что результатом накопления мутаций могут становиться нефункциональные аллели, или аллели, продукты которых по-разному отвечают на инфекцию разными расами патогена. Поэтому “вливать” надо не гены, а конкретные аллели, и в обзоре литературы надо четко формулировать эти моменты.

4. Обзор литературы обрывается внезапно сразу после таблицы с R-генами. Явно не хватает заключения.

Глава «**Материалы исследования**» размещена на трех страницах рукописи диссертации, содержит перечень генотипов из коллекции ВИР, использованных в работе, а также данные, использованные для *in silico* анализа. Несмотря на небольшой объем главы, примерно половина ее не имеет отношения к материалам, а описывает постановку секвенирования и результаты гибридологического анализа.

Глава «Методы исследования» написана гораздо понятнее, чем предыдущая, включает описание классических методов фенотипической оценки, описание фитопатологических, молекулярно-генетических и биоинформатических методов исследования. К этому разделу возник один вопрос и одно замечание.

1. Какие вирусы выявляли иммуноферментным методом?
2. В описании биоинформатических методов присутствует описание результатов, касающиеся интрон-экзонной структуры гена *Grol-4* и копийности R-генов.

Глава «Результаты и обсуждение» представлена на 50 страницах, описывает итоги всех проделанных экспериментов (характеристика морфологии образцов ПКВ картофеля, признаков продуктивности, устойчивости к патогенам в полевых и лабораторных тестах, устойчивости к нематодам, молекулярно-генетические и биоинформатические исследования R-генов).

Раздел «Морфологическое разнообразие ПКВ картофеля из коллекции ВИР» написан понятно, содержит ценную информацию, вопросов и замечаний к нему нет.

Раздел «Иммунологическая характеристика и скрининг ПКВ картофеля в коллекции ВИР на наличие маркеров R-генов» вызывает недоумение как по своей структуре, так и по содержанию. Во-первых, название раздела не дает четкого представления, о чем пойдет речь. В этом разделе, строго говоря, нет иммунологической характеристики образцов картофеля. Есть данные о заражении патогенами и вредителями, а также попытка проследить связь между признаком устойчивости к фитофторе и некоторыми молекулярными маркерами.

Во-вторых, подача материала в этом разделе не совсем логична, что затрудняет восприятие текста. Например, на странице 64 описан анализ проявления SCAR-маркеров *Rpi*-генов у ПКВ картофеля. Никакой связи между проявлением устойчивости и наличием тех или иных фрагментов молекулярных маркеров не выявлено. Это не удивительно, поскольку данные с одного вида картофеля переносили на другой, не имея четкой картины о природе изменений на уровне ДНК, обнаруживаемых использованными маркерами. Это происходит как раз потому, что важно не присутствие гена вообще, а наличие конкретных аллельных вариантов. Соответственно, важно было понять, что находится внутри амплифицированных фрагментов у контрастных по устойчивости форм. Для этого фрагменты были отсеквенированы. Но результаты секвенирования представлены через 20 страниц текста. Там же мы находим попытки объяснить полученную картину. При такой подаче приходится «перескакивать» между главами, или рисковать упустить или забыть что-то важное, перечитывая главы в том порядке, как они представлены.

Раздел “*In silico* анализ полиморфизма R- генов у ПКВ картофеля” представляет наибольший интерес, поскольку в нем собран воедино весь материал о различиях исследуемых генов на нуклеотидном уровне, а также различиях предполагаемых продуктов этих генов. Данный раздел содержит много фактического материала, пригодного для планирования дальнейших работ, позволяет понять те нестыковки, с которыми столкнулся автор при попытке использовать SCAR-маркеры.

Раздел “R- гены у образцов ПКВ картофеля в коллекции ВИР” посвящен анализу последовательностей ПЦР-фрагментов SCAR-маркеров, а не полноразмерных генов, поэтому сделать окончательных выводов о том, что является причиной устойчивости или восприимчивости к болезни, не приходится. По этим данным можно разработать молекулярные маркеры конкретных аллелей для изучения совместного наследования, что и было сделано в данной работе.

Следует отметить, что молекулярные маркеры, разработанные таким образом, применимы только к конкретным гибридным комбинациям, поскольку полиморфный участок, к которому они подобраны, не обязательно является причиной изменения фенотипа. Поэтому, применение таких молекулярных маркеров на другом материале, как правило, оканчивается неудачей, что и увидели авторы при попытке анализа другого растительного материала.

К этому разделу есть не только замечания, но и вопрос.

На странице 85 автор пишет: «На данном участке в двух последовательностях обнаружены двух-нуклеотидные инсерции (рисунок 16), ведущие к образованию стоп-кодонов: у среднеустойчивого *S. goniocalyx* к-9922 и восприимчивого *S. × ajanhuiri* к-9911-139... Таким образом, в последовательности маркерного фрагмента Rpi-sto1-890 мы не обнаружили замен, ассоциированных с проявлением признака устойчивости, все замены были или единичны, или присутствовали, как у устойчивых, так и у восприимчивых образцов». Почему преждевременный стоп-кодон не приводит к изменению устойчивости?

Общее замечание к экспериментальной части работы - отсутствие фотографий гелей, иллюстрирующих амплифицированные фрагменты и продукты рестрикции. В случае CAPS- маркеров иллюстративный материал очень важен. В идеале, нужно представить рестрикционную карту фрагмента с отмеченными полиморфными сайтами рестрикции, а рядом – электрофореграмму, из которой видно, какие сайты подверглись рестрикции у всех образцов (внутренний контроль), а какие только у определенных аллелей.

Есть несколько вопросов к формулировкам подписей к рисункам.

1. Рисунок 10 – Пример филогенетического дерева гомологов и паралогов R-генов на примере *Rpi-ber1*

- Что такое гомологи, ортологи, паралоги?

- Как корректнее назвать этот рисунок?

2. Как корректнее подписать Рисунок 12? – «Тепловая карта сходства кодирующих последовательностей R-генов (чьих) с их гомологами у ПКВ картофеля».

Формальное замечание: допустимо ли приводить еще не опубликованную статью в списке публикаций по теме диссертации?

В случае адекватных ответов на все поставленные вопросы и замечания, заключение оппонента по данной работе будет представлено в редакции, приведенной ниже.

Заключение

Диссертационная работа Гуриной Алёны Алексеевны “Полиморфизм R-генов у примитивных культурных видов секции *Petota* Dumort. рода *Solanum* L.”, представленная на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика, является завершённой научно-исследовательской работой в области частной генетики картофеля. В результате выполнения работы с использованием комплекса методов охарактеризованы образцы ПКВ картофеля коллекции ВИР. Проведен биоинформатический анализ результатов секвенирования R-генов ПКВ картофеля, имеющихся в открытых базах данных, вскрыты закономерности распределения нуклеотидных замен в изучаемых генах. Проведенная научная экспертиза диссертации, автореферата и списка опубликованных работ даёт основание положительно оценить выполненное исследование с точки зрения актуальности, степени обоснованности научных положений и выводов, степени их достоверности и новизны. Основные идеи исследования изложены ясно, выводы соответствуют полученным результатам. Все представленные в диссертационной работе результаты опубликованы в журналах из списка ВАК, а также обсуждены на международных и всероссийских конференциях. Тема диссертации, публикации по работе и положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют специальности 1.5.7 – генетика.

Диссертационная работа Гуриной Алёны Алексеевны “Полиморфизм R-генов у примитивных культурных видов секции *Petota* Dumort. рода *Solanum* L.”, по своей актуальности, научной значимости и новизне полученных результатов, соответствует всем требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении научных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата

Заместитель начальника
Управления кадров СПБГУ
Н. К. Корельская