

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ИНСТИТУТ  
ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»  
(ИЦиГ СО РАН)

Пр-т. Академика Лаврентьева, д. 10, Новосибирск, 630090  
Телефон: (383) 363-49-80  
Факс (383) 333-12-78  
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru  
https://www.icgbio.ru  
ИНН 5408100138/КПП 540801001  
ОКПО 03533895 ОГРН 1025403657410

от 20.02.2024 № 15345-29-26/дс1  
на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_



th Кочетов А.В.  
« 20 » 02 2024 г

### ОТЗЫВ

ведущей организации Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» на диссертационную работу Гуриной Алёны Алексеевны, выполненную на тему «Полиморфизм *R*-генов у примитивных культурных видов секции *Petota Dumort.* рода *Solanum L.*» и представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – «генетика»

**Актуальность темы диссертационной работы.** Актуальность темы исследования обусловлена необходимостью создания высокоурожайных, устойчивых к болезням и вредителям сортов культурного картофеля. Для создания таких сортов требуется интрогрессия генов устойчивости (*R*-гены). Примитивные культурные виды (ПКВ) картофеля относятся к первичному генофонду, представители которого легко скрещиваются с *S. tuberosum L* и отличаются большим разнообразием генотипов, устойчивых к различным заболеваниям. Однако, данная группа видов пока еще плохо изучена с точки зрения аллельного полиморфизма *R*-генов, анализ которого позволит разработать молекулярные маркеры для скрининга и селекции соответствующих генотипов. Помимо практического значения, исследования особенностей полиморфизма генов, отвечающих за устойчивость к болезням,

Вх. № 595  
от 06.03.2024 г.

может внести новый вклад в понимание эволюционных процессов, лежащих в основе введения растений в культуру, и совместного действия искусственного и естественного отборов.

**Научная новизна исследования** В диссертационной работе Гуриной А.А. впервые проведена комплексная оценка образцов ПКВ картофеля 4-х видов (*S. ajanhuiri* Juz. et Buk., *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. stenotomum*) из клоновой коллекции ВИР по морфологическим, фитопатологическим, хозяйственно-ценным и молекулярно-генетическим признакам. Впервые проведено секвенирование и охарактеризован полиморфизм нуклеотидных последовательностей маркерных фрагментов генов устойчивости к фитофторозу (*Rpi-vnt1*, *RB/Rpi-blb1*) и золотистой картофельной нематоде (ЗКН) (*Gro1-4*). Выявлена связь одного из аллельных вариантов гена *Rpi-vnt1* с устойчивостью к фитофторозу у образца *S. stenotomum* к-11020–283. Проведен *in silico* поиск и анализ *R*-генов у ПКВ картофеля и впервые установлено наличие гомологов кодирующих последовательностей генов устойчивости к фитофторозу (*Rpi-R3b*, *Rpi-ber1*), вертициллёзному увяданию (*Ve1*, *Ve2*), цистообразующим нематодам (*Gro1-4*, *Gpa2*) и вирусу X (*Rx1*) у ПКВ картофеля. Впервые показана неравномерность частот замен в нуклеотидных последовательностях различных *R*-генов.

**Теоретическое и практическое значение результатов исследования.** Выявлены образцы клоновой коллекции ПКВ картофеля ВИР устойчивые к фитофторозу – 14 генотипов и ЗКН – 8 генотипов, а также образцы потенциально интересные для генетического анализа других признаков: многоклубнёвость, окраска мякоти клубня, стабильность урожая. Выявлена потенциальная перспективность использования ПКВ в качестве источников гена устойчивости к вертициллёзному увяданию *Ve1*. Для ПКВ картофеля впервые изучен полиморфизм нуклеотидных последовательностей гомологичных различным референсным *R*-генам с использованием сочетания *in silico* анализа сборок геномных последовательностей и собственных данных секвенирования маркерных фрагментов этих генов. В результате сделан ряд важных теоретических выводов об эволюции *R*-генов, в частности, установлена неравномерная скорость аминокислотных (а.к.) замен в разных доменах NLR, наиболее высокая – в составе LRR-домена, отвечающего за связывание с эффектором патогена. В коллекции ВИР выявлено несколько аллельных вариантов гена *Rpi-vnt1* и показано, что устойчивость у *S. stenotomum* к-11020-283 коррелирует с конкретным аллельным вариантом этого гена. Разработаны CAPS-маркеры для идентификации различных аллелей *Rpi-vnt1*.

**Рекомендации по использованию результатов диссертации.** Рекомендуется использовать полученные результаты в институтах и селекционных центрах, где ведутся работы по созданию сортов картофеля, устойчивых к различным патогенам. Результаты также могут быть использованы в лекционных курсах «Генетические способы защиты растений».

«Эволюция генома растений» и «Теория селекции» на биологических и агрономических факультетах профильных учебных заведений.

**Степень обоснованности научных положений и выводов.** Научные положения, изложенные в диссертации Гуриной А.А. полностью обоснованы с применением комплекса фитопатологических, молекулярно-генетических и биоинформационных методов, соответствующих поставленным задачам и уровню аналогичных исследований, проводимых в мире. Это подтверждается публикацией результатов исследований в 4-х статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК, и входящих в международные системы цитирования Scopus и Web of Science. Выводы, сделанные на основе полученных результатов, полностью обоснованы.

**Структура и общая характеристика диссертации** Диссертационная работа Гуриной А.А. имеет стандартную структуру. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Материал диссертации изложен на 147 страницах машинописного текста, иллюстрирован 12 таблицами и 28 рисунками. Диссертантом детально проанализирована литература по теме исследования, список литературы включает 258 работ, из них 238 на иностранном языке.

**Во введении** соискатель обосновывает актуальность проведенного исследования, степень разработанности темы исследования в мировой науке, формулирует цель, основные задачи и положения, выносимые на защиту, показывает научную новизну и значимость проделанной работы.

**В первой главе** представлен обзор литературы, в котором в начале обобщены данные, касающиеся места примитивных культурных видов картофеля в систематике этой культуры, дано описание морфологических признаков, характерных для данной группы видов, особенностей их возделывания, географического распространения. Далее, в отдельной главе представлено современное состояние исследований в области генетики картофеля и те проблемы, которые возникают при проведении этих исследований: высокое видовое разнообразие и внутривидовой полиморфизм, гетерозиготность, распространенность авто- и аллополиплоидии, нескрещиваемость некоторых видов, отсутствие у многих видов самоопыления, что препятствует проведению гибридологического анализа. Все это подчеркивает сложность данного объекта и те трудности, с которыми столкнулся автор диссертации в ходе своей работы. Большой раздел посвящен механизмам устойчивости растений к заболеваниям, которые описаны очень подробно с огромным количеством ссылок и автору удалось полностью отразить современные представления о различных подсистемах иммунитета растений, как внеклеточного, так и внутриклеточного. И, наконец, последний

раздел посвящен различным заболеваниям картофеля, а также генам устойчивости, которые на данный момент охарактеризованы. В целом, обзор написан грамотно, аккуратно, разделы представлены в логической последовательности.

**Во второй и третьей главах** диссертантом подробно описываются материал и методы, применяемые при проведении исследования. Хочется отметить уникальность материала ПКВ картофеля из коллекции ВИР и то, что была проведена огромная предварительная работа по сохранению, детальной ботанической и физиологической характеристике и отбору данного материала, что отражено автором в соответствующем разделе. Глава Методы включает широкий спектр использованных методов, включающих целый набор фитопатологических, связанных с оценкой устойчивости к различным патогенам, а также современных молекулярно- генетических и биоинформатических методов для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

**В четвертой главе** представлены полученные соискателем результаты и их обсуждение. В начале проводится детальная оценка морфологического разнообразия ПКВ картофеля из коллекции ВИР по целому ряду признаков. Выделены и охарактеризованы образцы с потенциально интересными признаками, которые в дальнейшем могут использоваться в селекции культурного картофеля. Далее, в отдельных главах дана фитопатологическая оценка выборки образцов по устойчивости к фитофторозу и ЗКН, а также по поражению вирусными и другими заболеваниями. В следующем разделе представлены результаты *in silico* анализа полиморфизма *R*-генов у ПКВ картофеля, в результате которого были выявлены гомологи *R*-генов у данной группы видов и проведен их структурный и филогенетический анализ. Отдельные подразделы посвящены особенностям полиморфизма кодирующих нуклеотидных и аминокислотных последовательностей *R*-генов и их эволюции в пределах отдельных групп диких и культурных видов. Последняя часть работы затрагивает выделение и структурный анализ маркерных фрагментов ключевых генов, контролирующих устойчивость к фитофторозу и ЗКН, и использование этих маркеров для гибридологического анализа популяций от скрещивания родительских форм с контрастными по устойчивости фенотипами. В целом, по этой части работы, несмотря на то, что автору не удалось подтвердить эффективность разработанной системы маркеров для расширенной диагностики уровня устойчивости к данным заболеваниям (хотя один из маркеров и показал высокую эффективность- но на одном образце *S. stenotomum*), тем не менее, полученные результаты являются фундаментом для дальнейших поисков эффективных маркеров *R*-генов.

**Выводы,** сделанные соискателем, хорошо аргументированы и полностью соответствуют полученным данным, а также сформулированным целям и задачам работы

(есть ряд замечаний). Автореферат оформлен в соответствии с общепринятыми стандартами и соответствует содержанию диссертации.

Отмечая достоинства диссертационной работы, ее практическую значимость и научную новизну, можно высказать некоторые **замечания**:

1) Исходя из поставленных задач, создается впечатление, что вас интересовали исключительно гены устойчивости к фитофторозу и ЗКН (задачи 1-3). Несмотря на то, что это было главной задачей работы, тем не менее, следовало бы как-то отразить, что вас интересовали и другие R- гены, включенные в анализ *in silico*. **Задача 4 Создание и изучение гибридных популяций ПКВ картофеля от скрещивания родительских форм с контрастными фенотипами.** Следовало уточнить: ...с контрастными фенотипами по признакам устойчивости к патогенам.

2) **Теоретическая и практическая значимость.** Полученные нами данные о непропорционально большом числе замен в стартовой области гена, опубликованные сведения о гомологах этого гена у других видов картофеля, и схожесть другого участка с консенсусной последовательностью Козак для двудольных, являются основой для предположения об иной локализации старт-кодона гена *Rpi-vnt1* у ПКВ картофеля, по сравнению с референсной последовательностью. В этой части указываются только доказанные достижения, имеющие несомненное теоретическое или практическое значение. Данное предположение про иную локализацию старт- кодона в одном гене к таковым не относится.

Следующий абзац ....устойчивость у *S. stenotomum* к-11020–283... Устойчивость к чему?

3) Разработаны CAPS-маркеры для скрининга популяции от внутривидового скрещивания *S. stenotomum* к-11020–283 × *S. stenotomum* к-9301–276 на предмет наличия аллельного варианта *Rpi-vnt1*, ассоциированного с устойчивостью. Скрининг конкретной популяции проводился для верификации этих маркеров. Результаты этой верификации не подтвердились на расширенной выборке других образцов. Может сместить акцент на разработку маркеров различных аллельных вариантов данного гена для дальнейшего его функционального анализа и поиска ассоциации этих маркеров с устойчивостью к фитофторозу?

4) **Положения, выносимые на защиту.** Характер полиморфизма R-генов у ПКВ картофеля зависит от филогенетической удалённости вида-источника референсного гена от культурного картофеля. Как то невнятно: какой именно характер полиморфизма?

5) **Обзор литературы Глава 1.3.3.** Нет схемы NLR- рецепторов, которая здесь необходима.

6) **Глава 2. Материалы исследования** В таблице 3 указаны числа проанализированных образцов (в скобках- число генотипов). Не ясно- как идентифицировались эти генотипы- по каким конкретно генам? Или указать- что вы понимаете под словом «генотип».

7) **3.5 Молекулярно-генетический анализ.** Для секвенирования ампликоны очищали с использованием набора CleanUp Standart, производили лигирование в pAL-TA вектор (по протоколу, предлагаемому фирмой-распространителем Eurogen), а после трансформировали штамм DH5α E. coli. Не указано- сколько клонированных ампликонов секвенировали после трансформации?

8) **3.6.3 Анализ полиморфизма гомологов R-генов у ПКВ картофеля.** В сборках для многих генов были обнаружены многочисленные копии и исследована каждая копия, но в дальнейшем анализе использованы только наиболее схожие из тех, что производили полноценную аминокислотную последовательность. Как определить, что наиболее схожие копии являются функциональными, т.е. вносят основной вклад в развитие устойчивости в ваших условиях? Последние могут отличаться от природных, где действовал стабилизирующий отбор. По тексту видно, что вы осознаете эту проблему. Ответ, возможно, мог бы дать сравнительный анализ экспрессии различных R- паралофов в ответ на патоген. В ряде работ были установлены различия в транскрипции R- генов у устойчивых и восприимчивых растений. Наверное, это технически сложно сделать для всех паралофов по каждому гену, но, по крайней мере, для выбранных это имело бы смысл в качестве подтверждения их роли (в случае обнаружения повышения транскрипции у устойчивого образца относительно неустойчивого). Однако, для этого необходима разработка высоко-специфичных праймеров, что не всегда возможно.

9) **Выводы** следует нумеровать. Первому выводу следовало бы противопоставить соответствующую задачу, так как в задаче 1 фенотипическая оценка привязана к конкретным признакам устойчивости и скорее соответствует выводу 2. В выводе 3 было бы желательно указать: гомологичные последовательности каким конкретно R- генам (заболеваниям) выявлены?

**Минорные замечания:**

**Введение (стр. 12)** Методология исследования основана на использовании традиционных и современных подходов к биологическим исследованиям, анализе теории и новых разработок, используемых в современной науке. Абсолютно стандартная фраза, можно удалить.

**Стр 99 последняя строка ...аллель эффективная...** Аллель мужского рода, проверочные фразы: доминантный аллель, а не доминантная аллель, встречающийся аллель и тп. Несмотря

на особенности употребления в различных школах научных терминов, есть общепринятые в литературе правила правописания.

**Вывод 4 Различия в полиморфизме гомологов...** Полиморфизм можно убрать.

**Вывод 6 ..последовательности маркера Rpi-sto1-890 среднеустойчивого образца S. goniocalyx к-9922 обнаружена двухнуклеотидная делеция,** Эта же делеция обнаружена у одного восприимчивого образца.. **Оба варианта явно препятствуют функционированию гена.** Делеции приводят к сдвигу рамки считывания,- так и следовало написать.

Высказанные замечания, однако, не касаются основных результатов диссертационной работы, определяющих ее новизну и научную значимость, и не снижают общей высокой положительной оценки диссертационной работы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Гуриной Алёны Алексеевны «Полиморфизм R-генов у примитивных культурных видов секции *Petota* Dumort. рода *Solanum* L.» является завершённой и оригинальной научно-исследовательской работой, отличается новизной и актуальностью. Она полностью соответствует уровню современных биологических исследований. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Выполненные исследования позволили соискателю получить фундаментально значимые результаты, внесшие вклад в современные представления о механизмах устойчивости растений к патогенам, роли отдельных генов устойчивости в этих механизмах. Приведенные в работе научные положения, выводы и рекомендации аргументированы, основаны на фундаментальных научных положениях, общепринятых теоретических закономерностях, опираются на экспериментальные данные и являются их логическим следствием. В работе нет взаимно противоречивых выводов.

Основные результаты представлены в 4 научных работах, опубликованных в ведущих российских и иностранных журналах, рекомендованных ВАК.

По уровню научной значимости полученных результатов, по их новизне и оригинальности диссертационная работа Гуриной Алёны Алексеевны «Полиморфизм R-генов у примитивных культурных видов секции *Petota* Dumort. рода *Solanum* L.» полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции 26.10.2023 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Гурина Алёна Алексеевна заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Отзыв на диссертацию Гуриной А.А. обсужден и утвержден на семинаре лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», протокол № 1 от 16 февраля 2024 г.

Дата (20.02.2024).

Доктор биологических наук по специальности 03-02-07 (генетика), заведующий лабораторией инновационных средств защиты растений, ведущий научный сотрудник Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»



Щербань Андрей Борисович

Ученый секретарь Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», кандидат биологических наук

Орлова Галина Владимировна

Согласен на сбор, обработку, хранению и передачу моих персональных данных при работе диссертационного совета Д 24.1.235.01 по диссертационной работе Гуриной Алёны Алексеевны «Полиморфизм R-генов у примитивных культурных видов секции *Petota Dumort.* рода *Solanum* L.», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.



Андрей Борисович Щербань

Подпись Щербаня Андрея Борисовича удостоверяю  
Ученый секретарь  
ИЦиГ СО РАН, к.б.н.

Орлова Г.В.



Адрес ведущей организации: 630090 г. Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 10  
Телефон организации: +7 (383) 363-49-80  
Сайт организации: <https://icg.sibsc.ru>  
Электронная почта: [atos@icg.sibsc.ru](mailto:atos@icg.sibsc.ru)

