

**Отзыв официального оппонента**  
**на диссертационную работу Ефремова Глеба Ильича на тему**  
**«Анализ структурных и регуляторных генов биосинтеза каротиноидов**  
**у культивируемых и дикорастущих видов *Solanum* секции**  
***Lycopersicon*», представленной на соискание ученой степени кандидата**  
**биологических наук по специальности 1.5.7 – «Генетика».**

**Актуальность темы.** Пути метаболизма высших растений, обладающих сложной системой взаимосвязанных биохимических процессов, представляет чрезвычайный интерес для изучения. Каротиноиды являются одними из основных классов вторичных метаболитов растений. Они участвуют в фотосинтезе, выработке фитогормонов и сигнальных молекул для роста и развития растений. Наиболее важной функцией каротиноидов является защита от окислительного стресса в фотосинтезирующих тканях. В запасующих тканях каротиноиды определяют пигментацию, что важно для опыления и распространения семян. Каротиноиды также важны для человека, прежде всего, как антиоксиданты, супрессоры воспалительных процессов и онкогенеза, а также источники провитамина А.

Путь биосинтеза каротиноидов преимущественно исследуется на отдельных модельных растениях. В связи с этим структурно-функциональная характеристика генов метаболизма каротиноидов в различных органах и в процессе созревания плода у образцов культивируемого (сортов и линий) и дикорастущих видов томата с использованием комплексного подхода (морфофизиологического, молекулярно-генетического и биохимического) – тема диссертационной работы Ефремова Г.И., является, несомненно, актуальной.

Полученные данные позволяют прояснить регуляцию путей биосинтеза каротиноидов у различных видов растений, отличающихся содержанием данных метаболитов.

**Научная новизна.** В диссертационной работе впервые проведён сравнительный анализ содержания общих каротиноидов, ликопина и  $\beta$ -каротина в листьях и плодах в процессе созревания у образцов дикорастущих зелено-, желто- и красноплодных видов томата. Были впервые определены и охарактеризованы кодирующие и регуляторные последовательности ключевых генов биосинтеза каротиноидов (*PSY1*, *Z-ISO*, *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*, *NCED1*, *NCED2*) у сортов и образцов дикорастущих видов томата, что может быть важно для процесса селекции отечественных сортов. Проведён сравнительный межвидовой анализ

транскрипции генов *PSY1*, *Z-ISO*, *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*, *NCED1*, *NCED2* в листьях, бутонах, цветках, плодах (от 2 до 4 стадий развития) красно- и зеленоплодных видов томата, что улучшает понимание процесса эволюции биосинтеза каротиноидов. Была показана ключевая роль гена *NCED1* в процессе развития/созревания плода томата, наибольшая активность которого приходится на стадию смены окраски плода. Показана прямая корреляция между уровнями экспрессии гена транскрипционного фактора *RIN* и его генов-мишеней в динамике созревания плода красно- и зеленоплодных видов томата. Также диссертантом была предложена схема регуляции метаболизма каротиноидов у зеленоплодных и красноплодных видов томата.

Полученные диссертантом данные о содержании каротиноидов в листьях и плодах видов и сортов томата в процессе созревания, уровне полиморфизма ключевых генов биосинтеза каротиноидов, особенности их экспрессии и регуляции у дикорастущих и культивируемых видов томата обладают несомненной научной значимостью и научной новизной. Результаты данной работы позволили охарактеризовать новые гены-гомологи у зеленоплодных видов томата, прояснить процесс эволюции биосинтеза каротиноидов у видов томата и охарактеризовать их транскрипцию в динамике созревания плода. Также диссертантом был предложен возможный сценарий эволюционных преобразований, способствовавший возникновению красноплодных видов томата. Практическая значимость работы заключается в том, что впервые сорта отечественной селекции охарактеризованы на предмет наличия двух мутаций *tangerine*, выявлены доноры мутации *tangerine 1381*. Разработанные маркеры уже используются в программах ФНЦО РАН для селекции оранжевоплодных сортов томата.

По результатам работы опубликовано 7 научных работ, в том числе две публикации в журналах первого квартиля; кроме этого, Ефремов Г.И. участвовал в отечественных и международных конференциях, где представлял результаты исследования.

**Характеристика и оценка содержания диссертационной работы.** Диссертационная работа Ефремова Г.И. изложена на 175 страницах, включая 11 таблиц и 50 рисунков. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, обсуждения результатов, заключения и выводов, а также списка литературы (включает 255 источников, из них 239 на иностранном языке).

**Во введении** отмечена актуальность и степень разработанности темы исследования, основные научные проблемы, цели и задачи исследования,

научная новизна, теоретическое и практическое значение полученных результатов.

**Обзор литературы** включает имеющиеся литературные данные о вторичных метаболитах, их характеристике, важности для растений. Подробно рассматриваются стадии созревания плодов томата и изменения в качественном и количественном составе каротиноидов. Отдельно охарактеризованы гены каротиногенеза, механизмы регуляции их биосинтеза. В диссертации показано, что содержание каротиноидов зависит не только от вида, а также от стадии созревания плодов и регуляторных механизмов.

Следует отметить, что диссертантом найдено и проработано большое количество отечественных и зарубежных источников, включая статьи 2022-2023 гг. Обзор охватывает все задачи, затронутые в работе. Обзор выстроен логично и дает полное представление о вторичных метаболитах, их строении, функциях, биосинтезе, а также содержании каротиноидов в различных органах растений.

**В главе «Материалы и методы»** подробно описаны экспериментальные методики и подходы, используемые для решения поставленных в рамках диссертационной работы задач. Используемые диссертантом методы современны, адекватны целям и задачам исследования и соответствуют предъявляемым к работам критериям воспроизводимости. Содержание главы свидетельствует, что диссертантом была проделана большая работа по освоению различных методов исследования и что он в совершенстве ими владеет.

**Глава «Результаты и обсуждение»** посвящена результатам исследований, их обсуждению и анализу. Результаты представлены четко и ясно. Каждый раздел посвящен определенной теме, в конце раздела представлен краткий вывод.

**Раздел 3.1** посвящен биохимическому анализу и определению содержания общих каротиноидов, ликопина,  $\beta$ -каротина в исследуемых образцах томатов секции *Lycopersicon* рода *Solanum*.

**В разделах 3.2 и 3.3.** был сделан акцент на молекулярно-генетическую характеристику генов каротиногенеза, их экспрессию и механизмы регуляции. Диссертант приводит результаты детальной структурно-функциональной характеристики генов-гомологов фитоинсинтазы *PSY1* и 15-цис-зета( $\zeta$ )-каротинизомеразы *Z-ISO* у сортов и видов *Solanum* секции *Lycopersicon*. Диссертантом была идентифицирована (амплифицирована, клонирована и секвенирована) и детально охарактеризована 21 новая последовательность генов гомологов *PSY1* и *Z-ISO* у 12 сортов и девяти

дикорастущих видов томатов. Было показано, что содержание каротиноидов в спелых плодах в значительной степени контролируется генами *PSY1* и *Z-ISO* и напрямую коррелирует с их уровнем экспрессии.

**Раздел 3.4** посвящен характеристике генов-гомологов каротин-цис-транс-изомеразы *CRTISO* в сортах и дикорастущих видах томата. Впервые у видов томата были охарактеризованы кДНК всех трех гомологов. Была показана ключевая роль именно гена *CrtISO* в каротиногенезе в листьях и плодах как у красно- так и у зеленоплодных видов томата. Также подтверждена роль *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* в биосинтезе каротиноидов преимущественно в фотосинтезирующей ткани.

**В разделе 3.5** приводятся результаты по идентификации и структурно-филогенетической характеристике в сортах и дикорастущих видах томата генов-гомологов 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназы *NCED*, влияющих на синтез абсцизовой кислоты. При этом выявлена ключевая роль гена *NCED1* в созревании плода томата.

**Раздел 3.6** описывает экспрессию транскрипционного фактора *RIN* в динамике созревания плодов у красноплодных и зеленоплодных видов томата. Проведенный анализ вариабельности показал, что последовательности и структура *RIN* зеленоплодных видов и эволюционно более позднего красноплодного *S. lycopersicum* одинаковы и единичные аминокислотные замены несут незначительные для функции регуляторного гена. Показана прямая связь между экспрессией регуляторного гена *RIN* и экспрессией его генов-мишеней в процессе созревания плода у красноплодных видов, в то время как у зеленоплодных видов для этих же генов наблюдается или минимальная экспрессия или ее отсутствие. Обобщая полученные в работе биохимические и молекулярные данные, автор предположил схему активации каротиногенеза в плодах красноплодных и зеленоплодных видов.

**В главе «Заключение»** суммированы результаты исследования. Она содержит краткое описание результатов и выводы, каждый из которых был обоснован в соответствующей главе. Все выводы подтверждены экспериментальными данными. Дана комплексная морфофизиологическая, молекулярно-генетическая и биохимическая характеристики сортов и видов томата. Проведенный анализ генов каротиногенеза у зеленоплодных и красноплодных видов томата позволил диссертанту предложить возможный сценарий эволюционных преобразований, способствовавший возникновению красноплодных видов.

### **Вопросы и замечания:**

1. Часть рисунков имеет плохое разрешение, не позволяющее в полной мере оценить представленную информацию.
2. Из текста диссертации не совсем ясно, как выращивались растения томата.
3. Не ясно, что такое NN-25, сорт, линия, или гибрид?
4. Таблицы 3.2.3 и 3.3.3 не имеют полноценного описания. Не совсем ясно значение цветных заливок отдельных ячеек, а также условных обозначений.
5. Отсутствует полноценное описание у рисунков 3.2.12 (нет объяснения некоторым символам, отображенным на рисунке) и 3.3.5 (нет описания для рисунка b).

Однако, сделанные замечания не противоречат положительной оценке диссертационной работы и не снижают ее научно-практической ценности.

**Общее заключение.** Основные результаты диссертации опубликованы в 7 научных статьях, в том числе и в журналах первого квартиля, результаты исследования апробированы на российских и международных конференциях. Следует отметить, что в работе приведен огромный фактический материал, полученный с использованием современных методов научных исследований. Также следует отметить комплексный подход в исследовании, использование как молекулярного, так и биохимического и биоинформационного анализа. В работе использовались современные методики и подходы молекулярной генетики, сформулирована тема и направления исследования, правильно спланированы эксперименты. В диссертационной работе представлены законченные научные результаты, отличающиеся новизной и научной значимостью. Выводы, сделанные диссертантом, полностью аргументированы и соответствуют поставленным задачам. Научные результаты в полной мере отражены в автореферате и опубликованных работах автора.

Таким образом, диссертационная работа Ефремова Глеба Ильича «Анализ структурных и регуляторных генов биосинтеза каротиноидов у культивируемых и дикорастущих видов *Solanum* секции *Lycopersicon*» полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ, от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, и является

завершенной научно-квалификационной работой, выполненной с использованием современных молекулярно-генетических методов.

Автор диссертационной работы Ефремов Глеб Ильич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – «Генетика».

Дивашук Михаил Георгиевич



Официальный оппонент,

Кандидат биологических наук по специальности 03.00.15 - генетика, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ) 127550 Москва, ул. Тимирязевская, д. 42 8-499-976-65-44, эл. Почта: divashuk@gmail.com

Подпись: Дивашук Михаил Георгиевич  
Заверяю: Ефремова Г.И.  
Ученый секретарь ФГБНУ ВНИИСБ  
«04» апреля 2024 г.

