

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

Актуальность темы

Диссертационная работа Ефремова Г.И. посвящена изучению важной для генетики растений теме – биосинтезу каротиноидов и механизмам их регуляции. Известно, что синтез и накопление каротиноидов является сложным процессом, в который вовлечены многие регуляторные и структурные гены. В свою очередь качественный и количественный состав каротиноидов влияет на многие клеточные процессы, прежде всего на фотосинтез, адаптацию к стрессам и онтогенез. В связи с этим изучение структурно-функциональной характеристики генов метаболизма каротиноидов в различных органах и тканях, несомненно, актуально. Ключевые ферменты и гены каротиногенеза хорошо изучены на модельных растениях, но у многих, в том числе сельскохозяйственных культур, процесс биосинтеза каротиноидов изучен недостаточно и обычно ограничивается одним видом. Поэтому исследование образцов томата секции *Lycopersicon*, включающих красноплодные и зеленоплодные виды, различающиеся содержанием каротиноидов, делает их идеальной моделью для изучения генных сетей биосинтеза и накопления этих вторичных метаболитов в плодах.

Научная новизна материалов диссертационной работы

В исследовании Ефремова Г.И. впервые проведён сравнительный анализ содержания общих каротиноидов, ликопина и β -каротина в листьях и плодах в процессе созревания у дикорастущих зелено-, желто- и красноплодных видов (*Solanum* секция *Lycopersicon*). Впервые определены и охарактеризованы кодирующие и регуляторные последовательности ключевых генов метаболизма каротиноидов (*PSY1*, *Z-ISO*, *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*, *NCED1*, *NCED2*) у сортов и образцов дикорастущих видов томата. Также впервые проведён сравнительный межвидовой анализ транскрипции генов *PSY1*, *Z-ISO*, *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*, *NCED1*, *NCED2* в листьях, бутонах, цветках, плодах в процессе созревания у красно- и зеленоплодных видов томата. Кроме этого, определено совместное участие генов *NCED1* и *NCED2* в процессе развития плода томата и показано что ключевая роль отведена гену *NCED1*. Была доказана прямая корреляция между уровнями экспрессии регуляторного гена *RIN* и его генов-мишеней в динамике созревания плода красно- и зеленоплодных видов томата.

Значимость результатов диссертационной работы для науки и практики

В исследовании проанализировано содержание каротиноидов в листьях и плодах в видах и сортах томата в процессе созревания, а также охарактеризованы уровни полиморфизма ключевых генов биосинтеза каротиноидов, особенности их экспрессии и регуляции у дикорастущих и культивируемых видов томата. Результаты данной работы позволили прояснить особенности функции и эволюцию генов каротиногенеза у видов томата секции *Lycopersicon*, отличающихся качественным и количественным составом каротиноидов. Предложен возможный сценарий эволюционных преобразований, способствовавший возникновению красноплодных видов томата. Практическая значимость работы заключается в том, что впервые сорта томата отечественной селекции охарактеризованы на предмет наличия двух мутаций *tangerine* что позволило выявить доноров мутации *tangerine 1381*. Разработанные маркеры используются в программах ФНЦО РАН для селекции оранжевоплодных сортов томата.

Оценка содержания диссертационной работы

Диссертационная работа Ефремова Г.И. построена по стандартному плану и состоит из введения, основной части, заключения, списка литературы (включает 255 источников, из них 239 на иностранном языке); изложена на 175 страницах, включая 11 таблиц и 50 рисунков.

Во введении сформулированы актуальность и степень разработанности темы исследования, основные научные проблемы, цели и задачи исследования, научная новизна, теоретическое и практическое значение полученных результатов.

Глава 1 «Обзор литературы» представляет собой детальное описание ферментных систем, обеспечивающих синтез каротиноидов в растениях. Показано, что эти соединения определяют адаптивность растений к внешним воздействиям и опосредуют реакцию растений на неблагоприятные условия окружающей среды. Большое внимание автором уделено молекулярным механизмам регуляции экспрессии генов биосинтеза каротиноидов у различных видов растений. Заключительный раздел главы посвящен морфологии и физиологии видов томата, которые были основными объектами исследования, с обоснованием, почему именно эти виды было целесообразно исследовать.

Обзор написан хорошим научным языком, он логичен, подробно описывает состояние научной проблемы. На основе анализа литературы делается заключение, какие нерешенные на сегодняшний день проблемы имеются в этой области. Обзор производит благоприятное впечатление, демонстрируя высокий уровень теоретической подготовки автора.

В главе 2 «Материалы и методы» представлено описание материалов и методов исследований. В работе использовались 12 дикорастущих видов и 45 сортов томата с

различной окраской плода. В работе использовался большой набор разнообразных современных методик. Глава свидетельствует о том, что автор уверенно владеет современными методами биохимического, молекулярного и биоинформатического анализа. Все методы описаны достаточно подробно.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» содержит результаты исследований, их обсуждение и анализ.

Автором приведены данные по определению содержания общих каротиноидов, ликопина, β -каротина в исследуемых образцах томатов секции *Lycopersicon* рода *Solanum*. Было показано, что качественный и количественный состав каротиноидов в листьях образцов красноплодных, желтоплодных и зеленоплодных видов относительно постоянен и представлен лютеином, β -крипсоксантином и виолоксантином, из чего можно заключить, что эволюция не затронула процесс биосинтеза каротиноидов в листьях. В то же время, в процессе созревания плодов происходят значительные качественные и количественные изменения в составе каротиноидов, при этом эти изменения различны у красноплодных и зеленоплодных видов.

Также в диссертации приводятся результаты по идентификации и структурно-функциональной характеристике ключевых генов каротиногенеза - (*PSY1*, *Z-ISO*, *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*, *NCED1*, *NCED2*) у сортов и образцов дикорастущих видов томата. Выбор генов для анализа полностью аргументирован. Для большинства видов томата впервые были охарактеризованы нуклеотидные и аминокислотные последовательности и оценена их вариабельность. Также для генов дикорастущих видов томата был определен профиль экспрессии анализируемых генов в динамике развития плода. Были получены интересные результаты по анализу профилей транскрипции генов каротиноид-изомераз и показана ключевая роль одного из генов – *CrtISO*, в каротиногенезе, как в листьях, так и в плодах, в то время как другие два гена участвуют в биосинтезе каротиноидов преимущественно в фотосинтезирующей ткани.

Необходимо отметить, что помимо структурных генов автором был взят в анализ и ген транскрипционного фактора *RIN*, который является основным регулятором созревания плодов томатов. Данный ген был детально проанализирован автором и показано, что у красноплодных и зеленоплодных видов томата структура *RIN* локуса одинаковая, и различия в окраске плода связаны с разным уровнем экспрессии гена в динамике развития плодов у красноплодных и зеленоплодных видов томата, особенно на последних стадиях созревания плода. Была выявлена прямая корреляция между уровнями экспрессии регуляторного гена *RIN* и экспрессии его генов-мишеней.

Диссертационная работа изложена хорошим научным языком, качественно оформлена и в достаточной мере иллюстрирована таблицами и рисунками. Обсуждение

полученных результатов корректно, выводы и предположения полностью аргументированы. Завершает работу предложенная автором интересная гипотетическая схема регуляции каротиногенеза у зеленоплодных и красноплодных видов томата.

Заключение сформировано в виде пяти основных выводов, каждый из которых был обоснован в соответствующей главе. Все выводы подтверждены экспериментальными данными. Целью данной работы стало использование комплексного морфофизиологического, молекулярно-генетического и биохимического подхода для структурно-функциональной характеристики генов метаболизма каротиноидов в различных органах и в процессе созревания плода у образцов видов томата секции *Lycopersicon*. Все поставленные автором цели и задачи, несомненно, достигнуты.

Вопросы и замечания по диссертационной работе.

1. Для целого ряда генов ответственных за биосинтез каротиноидов, проанализированных в работе, убедительно показано, что различия в цвете плодов у зеленоплодных / желтоплодных / красноплодных (доместицированных/дикорастущих) видов томата объясняется скорее не структурными различиями в последовательности ДНК, а дифференциальной регуляцией экспрессии этих генов. В частности, доказана прямая корреляция между уровнем экспрессии гена транскрипционного фактора RIN, который является основным регулятором созревания плодов томатов, и экспрессией его генов-мишеней, при отсутствии нуклеотидных замен, которые могли бы объяснить эту разницу. Для объяснения различий в уровне экспрессии RIN между зеленоплодными и красноплодными видами пришлось предположить «либо эпигенетические причины (деметилирование промотора RIN у красноплодных видов), либо активность вышестоящего ТФ, который приводит к активации экспрессии RIN у красноплодных видов». Вопрос: не было бы удобнее проанализировать уровень экспрессии гена RIN в расщепляющейся популяции (например, F₂) от скрещивания зеленоплодных и красноплодных сортов (может быть даже видов) томата, и выяснить совпадает ли eQTL, влияющий на изменчивость уровня экспрессии RIN в данной популяции, с локализацией самого гена RIN? Контролируется ли экспрессия гена RIN близлежащими цис-регуляторными элементами или ее действительно контролирует вышестоящий транскрипционный фактор, местоположение которого тоже «отметит» картированный на хромосомах eQTL?
2. Присутствовали ли в работе межвидовые гибриды или использовались только сорта и видовые образцы?
3. Не вполне удачное выражение на стр. 18 «Возникновение ярко цвета у отдельных видов окрашенных плодов и цветков называют ароморфозом, что является результатом

возникновения органоспецифичной экспрессии генов биосинтеза каротиноидов в тканях генеративных органов растения...». Было бы правильнее сказать, что возникновение ярко цвета у отдельных видов окрашенных плодов и цветков можно отнести к ароморфозам.

4. Словосочетание «дикий вид» лучше заменить на «дикорастущий вид». В частности, в предложении на стр. 93 «...определены (клонированы и секвенированы) полнокопийные последовательности 21 новых гомологов PSY1 у 12 сортов и девяти диких видов дикорастущих и культивируемых видов томатов секции *Lycopersicon* рода *Solanum*».

Вышеизложенные вопросы и замечания не являются существенными и не снижают научной значимости проведенного исследования. Принципиальных замечаний к содержанию и оформлению диссертационной работы нет.

Заключение. Анализ результатов работы Ефремова Г.И., обработка и изложение материалов, показали глубокое знание методов и методологии научных исследований, используемых для решения поставленных задач. В работе использовались современные методики и подходы молекулярной генетики, биохимии и биотехнологии, сформулирована тема и направления исследований, осуществлен дизайн экспериментов. Особенно стоит отметить комплексный методический подход к решению задач исследования. Молекулярно-генетическая часть, кроме традиционных методов амплификации, секвенирования, структурного и филогенетического анализа генов, включала также характеристику предсказанных белков по молекулярной массе, изоэлектрической точке, предсказание вторичной, третичной и четвертичной структуры белка, выявление функционально значимых замен аминокислотных остатков с помощью специализированных биоинформатических пакетов.

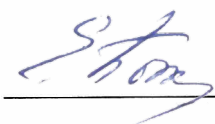
В ходе исследования получены важные практические результаты в виде разработанных молекулярных маркеров на мутации в гене CRTISO – tangerine 3183 и tangerine mic, приводящие к появлению плодов томата с желто-оранжевой окраской. Разработанные маркеры будут использоваться в селекции оранжево-плодных сортов томата.

В диссертационной работе представлены законченные научные результаты, отличающиеся научной значимостью и новизной. Их основное содержание в полной мере отражено в автореферате и опубликованных работах автора.

Диссертационная работа Ефремова Глеба Ильича «Анализ структурных и регуляторных генов биосинтеза каротиноидов у культивируемых и дикорастущих видов *Solanum* секции *Lycopersicon*», является законченной научно-квалификационной работой и соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ, № 842 от 24.09.2013, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Автор диссертационной работы Ефремов Глеб Ильич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика, профессор Центра Агротехнологий Сколковского института науки и технологий, профессор кафедры лесных культур института леса и природопользования Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С.М. Кирова»



Потокина Елена Кирилловна

11 апреля 2024 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С.М. Кирова»

Санкт-Петербург, Институтский пер., 5, к1, 1 учебное здание, ауд.1-345

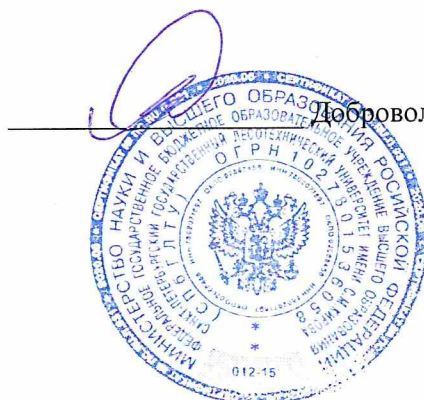
Эл. адрес: e.potokina@yahoo.com

Телефон: +7(812) 217-93-17

Рабочий телефон: +7(812) 217-93-17

Личную подпись Потокиной Е.К. заверяю:

Проректор по научной и международной деятельности Санкт-Петербургского государственного лесотехнического университета имени С.М. Кирова,
кандидат сельскохозяйственных наук



Добровольский Александр Александрович