

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 24.04.2024 № 15345-29-26/528
на № _____ от _____

УТВЕРЖАЮ
Директор ИЦиГ СО РАН
Академик РАН



А.В. Кочетов

«24» 04 2024

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН) на диссертационную работу Ефремова Глеба Ильича «Анализ структурных и регуляторных генов биосинтеза каротиноидов у культивируемых и дикорастущих видов *Solanum* секции *Lycopersicon*», представленную к защите в Диссертационный совет 24.1.235.01 при Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика.

Актуальность исследований

Каротиноиды являются важнейшими метаболитами, которые выполняют ключевые функции в жизни и развитии растений. Они участвуют в онтогенезе растения, фотосинтезе и защите от оксидативного стресса, являются предшественниками биосинтеза фитогормонов абсцизовой кислоты (АБК) и стриголактонов, которые в свою очередь опосредуют реакции на изменения внешней среды. Многочисленные исследования показали участие каротиноидов и их производных в формировании устойчивости растений к различным абиотическим стрессовым факторам. Кроме того, каротиноиды являются аттрактантами, придающими цветкам и плодам яркую окраску, тем самым способствуя опылению и распространению семян. Каротиноиды являются незаменимыми соединениями, благотворно влияющими на здоровье человека. Однако к настоящему времени пути биосинтеза каротиноидов изучены на модельных объектах ряда

сельскохозяйственных культур, при этом недостаточно информации о регуляции генов биосинтеза каротиноидов у дикорастущих сородичей. В связи с этим актуальность исследования, цель которого состоит в изучении структурно-функциональной характеристики генов метаболизма каротиноидов в различных органах и в процессе созревания плода у культивируемых и дикорастущих видов томата *Solanum* секции *Lycopersicon* не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования

Научная новизна работы состоит в том, что автором впервые проведен 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 получены данные по молекулярно-генетической характеристике генов биосинтеза каротиноидов (*PSY1*, *Z-ISO*, *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*, *NCED1*, *NCED2*) у образцов дикорастущих зеленоплодных видов томата. Впервые проведён сравнительный межвидовой анализ транскрипции генов *PSY1*, *Z-ISO*, *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*, *NCED1*, *NCED2* в листьях, бутонах, цветках, а также плодах в процессе созревания у красно- и зеленоплодных видов томатов. Проведен сравнительный анализ регуляторных последовательностей исследуемых генов каротиногенеза у красноплодных и зеленоплодных видов.

Показано совместное участие генов *NCED1* и *NCED2* в процессе развития/созревания плода томата. Ключевая роль отведена гену *NCED1*, наибольшая активность которого приходится на стадию смены окраски плода. Установлена прямая корреляция между уровнями экспрессии гена *RIN* и его генов-мишеней при созревании плода томата. Предложен возможный сценарий эволюционных преобразований, способствовавший возникновению красноплодных видов.

Достоверность и значимость результатов диссертационной работы

Достоверность результатов исследований подтверждается большим объёмом экспериментального материала, представленного в диссертационной работе и в статьях автора. Ефремовым Г.И. был обработан существенный объем теоретического и методического материала по теме диссертационной работы. Все научные положения, выносимые на защиту, в полной мере подтверждены результатами проведенных исследований, продемонстрированными в виде таблиц и рисунков. Обоснованность результатов представленной диссертационной работы определяется четко сформулированной целью и задачами, а также адекватным использованием экспериментальных подходов и статистических методов анализа результатов. Для реализации поставленных задач были использованы наиболее современные методы

молекулярной генетики, биохимического и биоинформатического анализов. Основные результаты, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно. Автор лично осуществил анализ литературных данных, планирование экспериментов, проведение лабораторных исследований, обработку экспериментальных данных.

Полученные Ефремовым Г.И. результаты имеют большое фундаментальное значение для понимания регуляции путей биосинтеза и накопления каротиноидов в различных органах растений. В исследовании проанализировано содержание каротиноидов в листьях и плодах у видов и сортов томата, в том числе в процессе созревания. Впервые у дикорастущих видов томата секции *Lycopersicon* определены нуклеотидные последовательности ключевых генов биосинтеза каротиноидов, а также охарактеризованы уровни их полиморфизма и особенности их экспрессии в различных органах растения. Результаты данной работы позволили прояснить эволюцию генов каротиногенеза у видов томата секции *Lycopersicon* и предложить возможный сценарий эволюционных преобразований, способствовавший возникновению красноплодных видов томата.

Практическая значимость работы заключается в том, что у сортов томата выявлены доноры мутаций, сцепленных с оранжевой окраской плода, и разработаны маркеры для идентификации данных мутаций, которые уже используются в селекционных программах.

Структура и объем диссертационной работы.

Диссертационная работа Ефремова Г.И. написана по традиционному плану, представлена на 175 страницах, содержит 11 таблиц и 50 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы. Список литературы включает 255 источников, из них 239 на иностранном языке.

Во введении изложена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы цели и вытекающие из них задачи работы, дается краткое обоснование актуальности исследования и степень разработанности данной темы.

В литературном обзоре диссертант подробно освещает данные о вторичных метаболитах растений, их классификации и функциях, приводит подробное описание пути биосинтеза каротиноидов и контролирующих его генов. Значительная часть обзора посвящена особенностям качественного и количественного состава каротиноидов в органах и тканях различных видов растений. Не менее подробно описаны транскрипционные факторы, которые участвуют в каротиногенезе. В последней части обзора литературы дана характеристика культивируемых и дикорастущих видов томата, особенности созревания плодов у красноплодных и зеленоплодных видов. Необходимо отметить, что Ефремов Г.И.

провел весьма значительную работу по анализу большого числа преимущественно зарубежных статей, в том числе опубликованных в последние годы.

Литературный обзор написан хорошим научным языком, исчерпывающе рассматривает как отечественные, так и иностранные публикации, отличается логичностью построения и анализа материала, в достаточной степени вводит в круг изучаемых проблем. **В главе Материалы и методы** приведено краткое описание методик исследования и сведения об используемом растительном материале. Для выполнения работы применялись такие современные методы, как биохимический анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), количественная ПЦР, клонирование, секвенирование и анализ экспрессии генов.

Результаты исследований и их обсуждение изложены в главе 3, разделенной на шесть разделов. В разделах 3.1, 3.2 и 3.3 описаны результаты качественного и количественного состава каротиноидов в листьях и плодах видов томата. Показаны различия в составе каротиноидов у красноплодных и зеленоплодных видов томата. Показано, что в плодах эволюционно более молодых красноплодных и желтоплодных видов состав каротиноидов и их содержание отличается от такового у более древних зеленоплодных видов.

Разделы 3.4 и 3.5 посвящены молекулярно-генетической характеристике ключевых генов метаболизма каротиноидов (*PSY1*, *Z-ISO*, *CrtISO*, *CrtISO-L1*, *CrtISO-L2*, *NCED1*, *NCED2*) у сортов *S. lycopersicum* и образцов дикорастущих видов томата. Была детально охарактеризована вариабельность кодирующих и белковых последовательностей этих генов и различия в профиле экспрессии этих генов в различных органах томата. Следует отметить, что впервые был проведен анализ регуляторных районов этих генов, что позволило выявить изменения в наборе регуляторных элементов промотора, связанные с тканеспецифичной экспрессией и реакцией на фитогормоны и стрессовые факторы у красноплодных и зеленоплодных видов.

Анализ транскрипции последовательностей трех генов каротиноид-изомераз позволил показать ключевую роль именно гена *CrtISO* в каротиногенезе и листьев, и плодов, в то время как два других гена *CrtISO-L1* и *CrtISO-L2* участвуют в каротиногенезе в фотосинтезирующей ткани. Также диссертантом получены интересные данные о роли генов *NCED1* и *NCED2* в созревании плодов томата.

В заключительном разделе 3.6 приводятся и обсуждаются результаты исследований по молекулярно-генетической характеристике транскрипционного фактора *RIN*, контролирующего созревание плодов томата. Показано, что структура *RIN* одинакова у красноплодных и зеленоплодных видов, а в динамике созревания плодов у красноплодных видов томата происходит значительная активация транскрипции по мере созревания плода,

особенно на последних стадиях, тогда как у зеленоплодных видов это не происходит. Сопоставление полученных результатов для транскрипционного фактора *RIN* для с данными по коэкспрессии генов пути биосинтеза каротиноидов позволило соискателю предложить схему регуляции каротиногенеза у зелено- и красноплодных видов томата.

В главе Заключение автор кратко обобщает полученные результаты и завершает свою работу в виде пяти выводов, которые сделаны на основе глубокого научного анализа и логично вытекают из полученных результатов научных исследований.

На основании представленных в диссертации Тяпкиной Д.Ю. результатов можно заключить, что работа, в целом, представляет собой целостное логически построенное исследование с применением современных молекулярно-генетических методов. Полученные результаты дополняют и расширяют известные к настоящему времени знания об экспрессии генов каротиногенеза у культурных и дикорастущих видов томата.

Замечания и вопросы по диссертационной работе:

1) Ряд замечаний относятся к подготовке главы Материалы и методы:

- Соискатель указывает, что использовали 36 образцов *S. lycopersicum*, тогда как список образцов в таблице 2.1 состоит из 45 сортов. Для сорта Черри арбуз не приведена окраска плода. В таблице с описанием культурных сортов отсутствует полная информация об их происхождении. В тексте (а не в заголовке таблицы) нужно было указать, кто предоставил образцы культурного томата.

- В списке растительного материала отсутствует описание образцов перца рода *Capsicum*, использованных для сравнительного анализа полиморфизма и экспрессии генов. Данная информацию частично присутствует в главе Результаты.

- Отсутствует список генов и их гомологов, которые планировали изучать в диссертационной работе, есть только список праймеров для генов. Информация о том, что были изучены гены *PSY1*, *Z-ISO*, *CRTISO*, *CRTISO-L1*, *CRTISO-L2*, *NCED1*, *NCED2*, появляется в главе Результаты по мере описания самих результатов исследования

- Не приведены методы статистической обработки результатов

2) Оценка содержания каротиноидов в разных органах и анализ экспрессии и полиморфизма структуры генов были проведены не на полной коллекции, а на выборочных образцах, при этом состав выборки в разных экспериментах не совпадает. Поэтому возникает вопрос, насколько достоверна связь найденных полиморфизмов с цветом плода, если сравнение, например, было проведено только с использованием одного или двух образцов с одинаковым цветом плодов.

3) На стр. 70 и в Выводах на стр. 148 по результатам биохимического анализа Автор сделал заключение, что «Качественный и количественный состав каротиноидов в листьях относительно постоянен в красноплодных, желтоплодных и зеленоплодных видах *Solanum* секции *Lycopersicon*». На основании чего был сделан вывод о постоянстве состава каротиноидов и о соотношении различных классов каротиноидов в листьях сортов с различным цветом плодов? В тексте диссертации представлены данные только по общей концентрации каротиноидов (рис. 3.1.1), при этом два красноплодных образца - сорт Heinz и вид *S. pimpinellifolium*, достоверно отличаются друг от друга, приблизительно, на 30% по содержанию каротиноидов. Что касается состава и соотношения каротиноидов, то в диссертации упомянуты только два образца *S. lycopersicon* (красный плод) и *S. pennellii* (зеленый плод), детальная информация состава каротиноидов даже для этих двух образцов не приведена.

4) В работе встречаются некорректные формулировки и ошибки:

- Подраздел главы Материалы и методы с описанием структуры праймеров на стр. 57 имеет странное название «Идентификация генов амплификации ДНК....»

- Данные по содержанию бета-каротина на рисунке 3.2.7 и в таблице 3.2.2 не совпадают

- Некоторые рисунки имеют низкое разрешение (например, 3.1.2, 3.2.7, 3.2.12, 3.5.4, 3.5.5, 3.6.3) и трудноразличимые подписи. У значительной части рисунков с гистограммами подписи осей почему-то на английском языке

- Присутствует путаница в нумерации некоторых таблиц, например, таблицы 3.1.1, 3.2.1

Высказанные вопросы и замечания не снижают значимости проведенного исследования.

Заключение

Обоснованность основных положений и выводов, сформулированных в диссертации, обусловлена высоким методическим уровнем исследования с использованием современных молекулярных, биохимических и биоинформационных методов анализа. Полученные результаты обладают научной значимостью и новизной. Научные положения и выводы объективны, логически осмыслены, полностью аргументированы и соответствуют поставленным задачам. Автореферат полностью соответствует диссертации. По результатам работы опубликовано 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК МОН. По актуальности проблемы, уровню методов, объему обработанного материала и научной новизне полученных результатов исследования, диссертационная работа Ефремова Глеба Ильича «Анализ структурных и регуляторных генов биосинтеза

каротиноидов у культивируемых и дикорастущих видов *Solanum* секции *Lycopersicon*», является научно-квалификационной работой, соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждении 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.

Отзыв заслушан и утвержден на заседании лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), протокол №2 от «22»_апреля 2024 г.

Доктор биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика, заведующий лабораторией биофортификации пшеницы, ведущий научный сотрудник Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук

Леонова Ирина Николаевна

Дата «23» апреля 2024

Согласна на сбор, обработку и передачу моих персональных данных при работе диссертационного совета Д 24.1.235.01 по диссертационной работе Ефремова Глеба Ильича «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.



Подпись Леоновой Ирины Николаевны удостоверяю

Ученый секретарь

ИЦиГ СО РАН, К.С.И.

Леонова Ирина Николаевна

Орлова Г.В.

Дата «23» апреля 2024

Сведения о ведущей организации

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН).

630090, Новосибирск, Россия, пр. ак. Лаврентьева, 10

Телефон: +7(383) 363-49-80

Факс: +7(383) 333-12-78

e-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru

Сайт: <https://www.icgbio.ru/>