

**Отзыв официального оппонента Матвеевой Татьяны Валерьевны  
на диссертацию Быковой Анастасии Владимировны  
«Структурно-функциональная характеристика генов, определяющих устойчивость  
картофеля к холодовому стрессу»,  
представленную на соискание степени кандидата биологических наук по  
специальности 1.5.7. – Генетика**

### **Актуальность темы**

Картофель остается ключевой продовольственной культурой, занимающей лидирующие позиции в мировом сельскохозяйственном производстве. Его высокая пищевая ценность во многом обусловлена благоприятным сбалансированным соотношением наиболее важных питательных веществ в клубнях. Поскольку для предотвращения прорастания и развития патогенов клубни картофеля хранят в течение 6–8 месяцев в картофелехранилищах при низких положительных температурах, представляет интерес изучение физиологических процессов, происходящие в запасающих органах картофеля при холодовом стрессе, а также их генетический контроль. Эти вопросы исследуются уже достаточно долго, однако в большинстве работ клубни подвергали кратковременному воздействию пониженных температур (около 1–2 суток), вследствие чего биохимические и молекулярно-генетические изменения, происходящие при более длительной (до 6,5 месяцев) холодовой инкубации, сопоставимой с условиями картофелехранилища, до последнего момента оставались практически неизученными. Дополнительный научный интерес представляет другой малоисследованный процесс — ответная реакция проростков картофеля на кратковременный холодовой стресс, характерный для периода весенних возвратных заморозков.

Таким образом, изучение молекулярно-генетических механизмов и структурно-функциональный анализ генов устойчивости картофеля к холодовому стрессу — как длительному, так и кратковременному — являются крайне актуальными.

### **Научная новизна**

Диссертационное исследование Быковой А.В. отличается высокой степенью научной новизны. **Впервые:**

- проведен транскриптомный анализ клубней картофеля в условиях длительного холодового стресса, что позволило расширить наши представления о генах вовлеченных в ответ на холодовой стресс;
- исследованы особенности экспрессии ключевых генов, контролирующих метаболизм крахмала, пути биосинтеза каротиноидов и антоцианов в клубнях и листьях при длительном (+3 °С, 4 и 7 месяцев) и кратковременном (+3 °С, 48 ч) холодовом стрессе;

- установлена динамика накопления основных углеводов (крахмала, моно- и дисахаридов) и вторичных метаболитов (каротиноидов, антоцианов) в клубнях сортов картофеля на фоне длительного холодового стресса;

- проведена комплексная структурно-функциональная характеристика генов  $\alpha$ -амилаз, их ингибиторов, фитоинсинтаз и ферментов биосинтеза антоцианов у образцов дикорастущих видов и сортов картофеля.

## **Научная и практическая значимость**

**Научная значимость** работы заключается в том, что полученные результаты уточняют и дополняют представления о молекулярных механизмах адаптации растений картофеля к холодовому стрессу. Выявлены новые гены, вовлеченные в ответную реакцию на холодовое воздействие. Определены особенности экспрессии генов углеводного обмена и биосинтеза вторичных метаболитов в клубнях и листьях картофеля при кратковременном и длительном стрессе, проведена их структурно-функциональная характеристика у различных видов и сортов.

**Практическая значимость** работы определяется тем, что выявлены гены-кандидаты для создания молекулярных маркеров, ассоциированных с устойчивостью картофеля к холодовому осахариванию, а также определены аллельные варианты гена ингибитора амилаз, которые могут быть использованы для молекулярной паспортизации сортов картофеля.

## **Структура и оценка содержания работы**

Работа выполнена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к кандидатским диссертациям. Она состоит из введения, основной части, заключения, приложений и списка литературы (310 источников); изложена на 156 страницах.

В Главе 1 соискателем проанализированы литературные источники и продемонстрировано современное состояние изучаемой проблемы. Большое внимание уделено изучению метаболизма крахмала и генов его контролирующих. Обзор содержит всю необходимую информацию для понимания актуальности, новизны и значимости поставленных научных задач.

Главе 2 описаны применяемые в работе материалы и методы. Основными объектами были выбраны шесть сортов картофеля, которые чаще всего фигурировали в работе. Использование большого набора разнообразных методик свидетельствует об уверенном владении соискателем современными биохимическими, молекулярными и биоинформатическими методами.

В Главе 3 представлены результаты диссертационной работы. В представленном диссертационном исследовании впервые проведён анализ транскриптомных изменений в клубнях картофеля сорта Леди Клер при длительном холодовом стрессе. Из числа дифференциально экспрессируемых генов выбраны гены углеводного, каротиноидного и флавоноидного обмена с наиболее выраженными изменениями экспрессии. Для ряда генов впервые показана вовлечённость в холодовую ответ.

В пяти сортах картофеля описаны изменения содержания крахмала и сахаров, а также экспрессии соответствующих генов при холодовом стрессе. Профили экспрессии в целом совпадают с транскриптомными данными, но указывают на генотип-зависимую регуляцию стрессового ответа.

Впервые охарактеризован профиль экспрессии гена  $\alpha$ -амилазы *StAmy23* в разных органах картофеля, выявлена положительная корреляция с содержанием крахмала. Проведена структурно-функциональная характеристика гена ингибитора амилаз у диких видов и 36 сортов, выявлены аллельные варианты для их молекулярной паспортизации.

Показано, что при длительном холодовом стрессе снижается транскрипция 16 генов биосинтеза каротиноидов, что коррелирует с содержанием общих каротиноидов. Впервые проведён анализ последовательностей генов *StPSY*, их экзон-интронной структуры, мотивов, доменов и филогении.

В листьях при кратковременном стрессе активируется экспрессия всех трёх фитоинсинтаз, а также семи генов биосинтеза антоцианов, выявлена корреляция с содержанием антоцианов.

Выносимые на защиту положения и выводы полностью обоснованы и вытекают из представленных экспериментальных данных.

Основные положения и результаты исследований по диссертации опубликованы в 7 работах, в том числе в рекомендованных ВАК. Результаты исследований апробированы на российских и международных конференциях.

Рукопись автореферата полностью соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Хочется особо отметить интересную идею работы и большой объем разноплановых экспериментов, выполненных в ходе ее реализации. К сожалению, также приходится отметить небрежность при написании некоторых разделов работы.

К тексту диссертации имеются **вопросы и замечания**.

1. С моей точки зрения Обзор литературы начинается «внезапно» с описания метаболизма крахмала (раздел 1.1). Далее в разделе 1.2 автор дает информацию о структуре и свойствах крахмала, вводит некоторые понятия (например, амилоза и амилопектин), которые уже были использованы в разделе 1.1. Если поменять эти разделы местами, текст бы стал логичнее и понятнее широкому кругу читателей.

2. Обзор украсила бы таблица со структурированной информацией о разнообразии ферментов метаболизма крахмала.

3. В тексте очень много неудачных формулировок, которые влекут искажение смысла элементов текста. Ниже представлены некоторые примеры.

- Стр. 9. «Биосинтез крахмала в картофеле предполагает скоординированное действие нескольких классов ферментов и субстратов.» Что подразумевается под скоординированным действием субстратов? Вероятно, речь идет о действии ферментов по отношению к субстратам?

- Стр. 11. «Первой реакцией биосинтеза крахмала в амилопласте является образование ферментом АДФ-глюкозопирофосфорилазой (AGPase) из глюкозо-1-фосфата и АТФ АДФ-глюкозы (ADP-Glc) (Ball and Morell, 2003).» Не понятно об образовании чего идет речь.

- Стр.29 «Однако, что интересно, в исследовании по зависимости уровня экспрессии с уровнем глюкозы не было обнаружено корреляции с экспрессией генов, метаболизма крахмала или сахаров перед хранением на холоду (Neilson et al., 2017)». Не понятно, что с чем коррелировало, а что не обнаружено. Термин «Экспрессия» употреблен дважды, но с разным смыслом.

4. В разделе «Материалы и методы» явно не хватает описания использованных в работе сортов. Какие признаки характерны для каждого из них. Это очень важно для последующей интерпретации результатов. На любой признак, изучаемый в динамике, могут влиять такие особенности сорта, как скороспелость, стрессоустойчивость, поэтому, беря в учет только календарный возраст, можно упустить важную информацию.

5. В разделе «Результаты и обсуждения» много вопросов вызывают подписи к рисункам и легенды, что затрудняет их восприятие, а также восприятие текста в целом. Иногда рисунки и текст не согласуются по представляемой информации. Ниже приведены примеры неудачных подписей к рисункам или несогласованностей иллюстраций с основным текстом.

- Рисунок 10 – На диаграмме Венна первая отмеченная временная точка 0,5 мес. По тексту 0 мес. Это одно и то же или разные точки?

- Рисунок 11 назван «Тепловая карта, отражающая изменения уровней экспрессии генов углеводного обмена в клубнях картофеля при длительном холодовом стрессе». На самом деле, гены на рисунке не обозначены, приведены лишь номера локусов. Стоило бы раскрыть названия генов. Это бы наполнило смыслом изображение.

- Рисунок 12 – «Изменение экспрессии генов углеводного обмена в клубнях в ответ на длительный холодовый стресс (3°C). С – сентябрь (20°C), Ф - январь, 3,5 месяцев стресса, А - март, 6,5 месяцев стресса (в качестве референсов использовались гены *Stsec3* и *Stef1*). Значимые различия экспрессии между органами растения при  $a-c p < 0,05$ .» На рисунке нет обозначений «а, с, ф». С января по март прошло меньше 3 месяцев. Между какими органами разница? На рисунке информация дана только про клубни.

- На рисунке 14 гены также не подписаны. Хорошо бы помимо тепловой карты привести на этом рисунке в общем виде схему биосинтеза флавоноидов и на ней отметить продукты генов повысивших и понизивших экспрессию.

- Из рисунка 16 не понятно, какие различия значимы? Что значит существенные различия?

- Рисунок 26 назван так: «Фрагмент экзона IV (А) и полные аминокислотные (Б) последовательности *StPSY* (подчеркнут фитоинсинтазный домен, в рамке выделен сайт отщепления транзитного пептида)». Таким образом, в названии рисунка упомянуты сразу и экзон и аминокислотная последовательность. В результате получилось, что курсивом выделено название белка, что не корректно.

6. В тексте раздела «Результаты и обсуждение» присутствуют элементы тавтологий. Ниже приведу примеры.

- Стр. 30. «Амилазы действует как на амилозу, так и на амилопектин и произвольно отсекают  $\alpha$ -1,4-цепь внутри сахарной цепи без различия субстрата, но не могут действовать на  $\alpha$ -1,6 цепи». Слово «цепь» использовано три раза с разными оттенками смысла. Лучше было бы писать про 1,4- и 1,6-связи.

- Стр. 31. «Основные каталитические домены АМУ и ВАМ у разных организмов имеют сходный каталитический домен». Смысл предложения понять сложно.

- Стр. 90. В одном предложении тавтология и не корректно использованный термин «гомология»: «Выравнивание последовательностей подтвердило более высокую гомологию последовательностей StPSY1 и StPSY2». Гомология – это сходство, основанное на общем происхождении. В представленном предложении речь идет не о степени гомологии, а о степени сходства последовательностей.

7. В тексте работы присутствуют ошибочно использованные термины.

- На странице 31  $\gamma$ -амилазы (глюкоамилазы) названы экзонуклеазами.

- В названии раздела 3.4.1. присутствует фраза «характеристика полногеномных последовательностей генов». Что это означает – геном внутри гена?

8. На странице 63 автор обсуждает уровни экспрессии исследованных генов. Не понятно, какие изменения экспрессии являются значимыми? В-1,3 или 1,6 или 2 и более раз?

9. На странице 64 написано следующее: «Следует отметить, что для некоторых этих генов, например, для генов *SWEET10*, *12*, *15* вообще была неизвестна их функция у растений, а транскриптомный анализ не только показал их вовлеченность в холодовый ответ, но и то, что гены *SWEET12* и *SWEET15* картофеля индуцируются холодовым стрессом». Что автор имеет в виду? Как именно транскриптомный анализ показал это? Если бы непосредственно холодом активировался другой ген - регулятор, активирующий эти гены, мы бы увидели другую картину?

10. На странице 72 дается заключение: «Для пяти генов *StGWD*, *StAmy23*, *StBAM1*, *StBAM9*, *StAI* показана корреляция (положительная и отрицательная) с изменением содержания крахмала и моносахаров при длительном холодовом стрессе». Лучше было бы уточнить где положительная, где отрицательная.

11. К разделу, посвященному ингибиторам амилаз видов картофеля есть вопросы:

- Изучались ли последовательности интронов в данном гене у картофеля. Есть ли в них какие либо важные регуляторные элементы?

- Оценивали ли соотношение синонимичных и несинонимичных замен у разных генотипов?

- Этот раздел украсила бы таблица, в которой стоило бы представить внутри- и межвидовой полиморфизм по различным типам замен и инделей, в том числе потенциально влияющих на структуру белка.

- Примечательно, что все описанные индели кратны трем. А были ли хоть у какого то из видов описаны аллели, потерявшие интактность?

- Был ли на трехмерных моделях белка изучен участок, взаимодействующий с субстратом. Какие в нем найдены замены?

12. В обсуждении межсортовых различий по реакции на холод не хватает анализа данных в контексте особенностей использованных сортов. Было бы желательно оценить связи между изученными признаками в комплексе. Известно, что многие формы ответа на одни и те же стрессовые воздействия могут быть обусловлены различными механизмами, вовлеченностью различных метаболитов. Иными словами, в данной работе адаптационный ответ у одного из сортов мог в большей степени быть связан с каротиноидами, а другого – с антоцианами.

Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной

работы, выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне, и оставляющей благоприятное впечатление.

### **Заключение.**

Диссертация Быковой Анастасии Владимировны представляет собой многоплановое и комплексное исследование и характеризуется научной новизной, выполнена на высоком теоретическом и практическом уровне. Работа имеет несомненное фундаментальное, а также практическое значение. В работе представлены новые научные результаты, использованы современные методики и подходы молекулярной генетики. 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 «Структурно-функциональная характеристика генов, определяющих устойчивость картофеля к холодовому стрессу», по своей актуальности, научной значимости и новизне полученных результатов, соответствует всем требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении научных степеней», утвержденного 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 биологических наук, а ее автор, Быкова Анастасия Владимировна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности «Генетика-1.5.7».

Профессор кафедры генетики и биотехнологии  
Федерального государственного бюджетного  
Образовательного учреждения высшего  
образования «Санкт-Петербургский  
государственный университет»,

199034, Санкт-Петербург, Университетская наб.,  
7/9, + 7 (812) 36 36 105

t.v.matveeva@spbu.ru

<https://bio.spbu.ru/faculty/departments/genetics/>

доктор биологических наук по специальности  
03.02.07 - генетика

Матвеева Татьяна Валерьевна

ЛИЧНУЮ ПОДПИСЬ

Матвеева Т.В.  
ЗАВЕРЯЮ



МЕСТИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА  
УЧРЕЖДЕНИЯ КАДРОВ СФБГУ  
Н. К. КОРЕЛЬСКАЯ

13.04.26.