

**Отзыв официального оппонента Дивашука Михаила Георгиевича на диссертацию
Быковой Анастасии Владимировны «Структурно-функциональная характеристика
генов, определяющих устойчивость картофеля к холодному стрессу»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.7. – Генетика**

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является ключевой продовольственной культурой в агропромышленном комплексе РФ, где содержание крахмала в клубнях определяет его универсальность в пищевой, кормовой и технической сферах. Длительное хранение клубней при +3-5°C (6-8 месяцев) необходимо для ингибирования прорастания и фитопатогенов, однако провоцирует холодное осахаривание с накоплением редуцирующих сахаров. Большинство исследований ограничивалось 1–4 месяцами хранения, игнорируя реальные условия хранилищ. Аналогично недостаточно изучен кратковременный стресс на проростках картофеля при возвратных весенних заморозках. Таким образом, определение молекулярно-генетических механизмов устойчивости растений картофеля к холодному стрессу представляет собой актуальную как фундаментальную, так и практическую задачу.

Новизна исследования и полученных результатов заключается в том, что соискателем впервые проведен транскриптомный анализ клубней картофеля при длительном воздействии низких температур (+3°C, до 6,5 месяцев), определены гены, чья экспрессия меняется в ответ на холодный стресс. Также впервые была определена динамика изменения содержания углеводов (крахмал, сахара) и вторичных метаболитов (каротиноиды, антоцианы) и экспрессия ключевых генов их биосинтеза в ответ на холодный стресс. Охарактеризованы гены α -амилаз, ингибиторов амилаз, генов биосинтеза каротиноидов и антоцианов у видов и сортов картофеля, включая аллельные варианты *StAI* для выявления маркеров селекции.

Значимость результатов диссертационной работы для науки и практики

Полученные результаты расширяют понимание молекулярных основ адаптации растений к холодному стрессу, идентифицируя гены-кандидаты для маркеров устойчивости к холодному осахариванию и молекулярной паспортизации сортов. Определены особенности транскрипции генов углеводного обмена и биосинтеза вторичных метаболитов и их характеристика у видов и сортов картофеля. Результаты работы уточняют молекулярные механизмы адаптации картофеля к холодному стрессу и позволяют выявить гены-кандидаты для создания молекулярных маркеров, определяющих устойчивость сортов картофеля к холодному осахариванию.

Оценка содержания диссертационной работы

Диссертационная работа Быковой А.В. изложена на 156 страницах, содержит 8 таблиц (4 в основном тексте и 4 в приложении) и 45 рисунков (44 в основном тексте и 1 в приложении). Работа имеет стандартную структуру и состоит из введения, основной части, заключения, приложения и списка литературы (включает 310 источников, из них 302 на иностранном языке).

Во введении сформулированы актуальность и степень разработанности темы исследования, основные научные проблемы, научная новизна, теоретическое и практическое значение полученных результатов. Для раскрытия темы диссертации логично сформулирована цель работы. Для достижения указанной цели в работе поставлены четкие, логически последовательные задачи.

В главе 1 «Обзор литературы» подробно освещаются современные данные о структуре и свойствах картофельного крахмала и генах его контролирующих. Затронута проблематика хранения клубней картофеля и холодого осахаривания при низкотемпературном хранении. В обзоре литературы отдельно подробно описаны основные ферменты метаболизма крахмала и их участие в ответе растения на холодовый стресс. В целом обзор литературы дает достаточно полное представление о современном состоянии исследований в области, которая имеет прямое отношение к предмету диссертации. При этом продемонстрирована эрудиция диссертанта и его умение анализировать научные данные.

В главе 2 «Материалы и методы» описаны материалы и методы исследований, используемые для выполнения данной диссертационной работы и решения поставленных задач. Глава дает представление об используемом методическом арсенале и позволяет убедиться в адекватности выбранных подходов для решения поставленных задач. Соискатель продемонстрировал владение широким набором самых современных биохимических и молекулярных методик, включая создание библиотек для транскриптомного анализа, клонирование и экспрессионный анализ, использование основных современных биоинформационных программ и баз данных для поиска и обработки полученных результатов.

В главе 3 «Результаты и обсуждение» подробно представлены и проанализированы полученные данные по каждому этапу работы.

Раздел 3.1 посвящен анализу транскриптома клубней картофеля сорта Леди Клэр и оценке функциональной активности генов в ответ на воздействие длительного низкотемпературного стресса, имитирующего хранение в картофелехранилище. В результате транскриптомного анализа обнаружено, что наиболее существенные изменения происходят в период первых 3,5 месяцев холодого стресса. Определены дифференциально экспрессируемые гены, связанные с углеводным обменом (37 ДЭГ), биосинтезом каротиноидов (14 ДЭГ) и антоцианов (29 ДЭГ), которые показали более чем двукратное изменение транскрипции. Данные гены были отобраны для дальнейшего более детального экспрессионного анализа на большем количестве сортов. Для ряда генов/семейств генов впервые показана их связь с ответом на холодовый стресс.

В разделах 3.2 и 3.3 соискатель приводит биохимические данные по изменению содержания углеводов и динамике экспрессии генов углеводного обмена в клубнях пяти сортов картофеля при длительном холодом хранении. Далее на основе транскриптомных и литературных данных были выбраны гены углеводного обмена, связанные с холодовым стрессом, для более детального анализа. Для ряда генов углеводного обмена (*StGWD*, *StAmy23*, *StBAM1*, *StBAM9*, *StAI*) показана корреляция с изменением содержания крахмала и моносахаров при длительном холодом стрессе.

В разделе 3.4 был сделан акцент на гене ингибитора амилаз. Впервые автором была проведена подробная идентификация и характеристика полногеномных последовательностей генов гомологов *AI* и их белковых последовательностей у образцов 12 клубнеобразующих дикорастущих и культивируемых видов картофеля и определены паттерны экспрессии гена в различных органах у видов картофеля. Кроме того, впервые были клонированы и секвенированы последовательности и проведен подробный анализ вариативности генных и белковых последовательностей и определение аллельных вариантов *StAI* у 36 отечественных сортов картофеля.

В разделе 3.5 приводятся результаты по определению содержания углеводов и анализ экспрессии другого углеводного гена – α -амилазы *StAmy23* в органах и тканях растений сортов картофеля. Стоит отметить, что экспрессия ранее изученного гена *StAmy23* была определена только в листьях и клубнях у одного сорта. Соискателем было показано, что данный ген транскрибируется также и в других органах (стебель, плод, стolon, корень); связь с биохимическими данными установила положительную корреляцию между уровнем транскрипции данного гена и содержанием крахмала.

Крайне важную часть экспериментальной работы составляет исследование содержания вторичных метаболитов, таких как каротиноиды и антоцианы, а также анализ динамики активности генов их кодирующих, представленных в разделе 3.6. Несмотря на показанное ранее участие этих метаболитов в ответ на холодовый стресс, у картофеля структурные гены их биосинтеза практически не изучены. В случае каротиноидов соискателем впервые были подробно охарактеризованы последовательности ключевых генов каротиногенеза – трех генов фитоинсинтаз *StPSY*, включая анализ их *cis*-регуляторных сайтов в промоторах. Полученные данные выявили большее сходство генов *StPSY1* и *StPSY2* в сравнении с *StPSY3*, и соискателем было высказано обоснованное предположение о возможном возникновении *StPSY1* и *StPSY2* в результате дупликации гена-предшественника. Также была впервые показана вовлеченность всех трех генов фитоинсинтаз, включая ген *StPSY3*, в ответ на кратковременный холодовый стресс, имитирующий возвратные весенние заморозки, у проростков сорта Леди Клэр.

Также соискателем было определено содержание общих каротиноидов и экспрессия 16 генов, охватывающих весь путь каротиногенеза, на клубнях пяти отечественных сортов картофеля. Показано, что, за некоторыми исключениями, все гены каротиноидов демонстрировали одинаковый экспрессионный профиль, показывая значительное снижение уровней транскриптов к 4 месяцам холодового хранения.

Соискателем были получены и проанализированы профили экспрессии генов биосинтеза антоцианов в листьях и клубнях при кратковременном и долговременном холодовом стрессе. В случае определения молекулярных изменений антоцианов в клубнях сорта Северное сияние при холодовом стрессе в анализ был взят сорт с фиолетовой окраской клубня, где в результате анализа изменения содержания антоцианов и динамики транскрипции двух генов биосинтеза антоцианов показана положительная корреляция. Анализ экспрессии пяти структурных генов и двух регуляторных в листьях картофеля с разным содержанием антоцианов при кратковременном холодовом стрессе показал значительную активацию транскрипции генов пути с разным временным ответом.

Глава «Заключение» отражает основные результаты исследования.

Все разделы диссертационной работы логично связаны, представленные результаты научно обоснованы. Сделанные диссертантом выводы по работе полностью обоснованы и непосредственно вытекают из полученных результатов.

Представленный автореферат по содержанию полностью соответствует диссертации.

Несмотря на высокий уровень проведенного диссертационного исследования, по работе есть несколько вопросов и замечаний:

1. Из текста диссертации не совсем ясно, почему для анализа транскриптома был взят сорт Леди Клэр. Чем обусловлен выбор именно этого сорта в качестве модели для изучения долговременного стресса? Были ли у него какие-то особенности

(например, устойчивость/чувствительность к холодovому осахариванию), которые предопределили его использование?

2. В разделе 3.4.3 при анализе экспрессии гена *AI* в различных органах четырех видов картофеля автором делается предположение о существовании «нескольких возможных сценариев регуляции содержания крахмала» (стр. 83). Кроме того, на стр. 82 высказано суждение о связи уровня экспрессии *AI* с устойчивостью к холодovому осахариванию (*CIS*-устойчивостью) для сорта Надежда и образца *S. kurtzianum*. Однако в работе не проводилось прямого измерения *CIS*-устойчивости этих конкретных образцов диких видов, авторы ориентировались лишь на литературные данные об ареалах произрастания. Для более строгого вывода было бы корректнее либо измерить содержание сахаров в этих образцах после холодovого стресса, либо смягчить формулировку, указав на потенциальную связь, требующую дальнейшей проверки.
3. Из текста диссертации не совсем ясна логика выбора объектов для двух ключевых экспериментов. Во-первых, чем руководствовался автор при выборе гена ингибитора амилаз (*StAI*) для столь детального структурно-функционального анализа (раздел 3.4), учитывая, что транскриптомный анализ выявил множество других дифференциально экспрессирующихся генов углеводного обмена, включая, например, гены семейства *SWEET*?
4. Хотелось бы уточнить, на основании каких критериев (например, данные Госсорткомиссии, происхождение, хозяйственно-ценные признаки) была сформирована выборка из 36 сортов картофеля для изучения аллельного полиморфизма гена *StAI*?
5. Некоторые рисунки, особенно 24 и 33, из-за обилия информации и мелкого шрифта сложны для восприятия. Их следовало бы либо разбить на несколько отдельных графиков, либо вынести часть данных в дополнительное приложение, чтобы улучшить читаемость.

Высказанные замечания и вопросы носят дискуссионный характер, направлены на уточнение позиции автора и ни в коей мере не умаляют значимости диссертационной работы.

В целом диссертация производит прекрасное впечатление и отличается высоким качеством представленных данных. При ознакомлении с работой становится очевидным, что соискатель в полной мере владеет как литературными данными по изучаемому вопросу, так и современными методами молекулярной биологии, биохимии и биоинформатики. Диссертационная работа содержит огромный экспериментальный материал и подробный его анализ.

Заключение

Диссертационная работа Быковой А.В. представляет собой законченное научное исследование, выполненное на высоком экспериментальном и методическом уровне с привлечением самых современных методов исследования, при помощи которых получены новые важные и оригинальные данные. Результаты данной работы имеют существенное теоретическое и практическое значение для дальнейших исследований в данной области, достоверность полученных данных не вызывает сомнений и подтверждена статистическим анализом. Выводы, сделанные из диссертации, полностью обоснованы и соответствуют

приведенным результатам. Материалы диссертационной работы достаточно полно отражены в семи публикациях, в пяти из которых соискатель является первым автором.

Диссертационная работа Быковой Анастасии Владимировны «Структурно-функциональная характеристика генов, определяющих устойчивость картофеля к холодовому стрессу», по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости соответствует требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в актуальной редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Быкова Анастасия Владимировна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – Генетика.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук по специальности 03.00.15 – генетика
заведующий лабораторией прикладной геномики и частной селекции
сельскохозяйственных растений Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ).


Дивашук Михаил Георгиевич

19 марта 2026 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

Почтовый адрес: ул. Тимирязевская 42, Москва, Россия, 127434

Тел. +7 (499) 976-65-44, e-mail: divashuk@gmail.com

Подпись кандидата биологических наук Дивашука Михаила Георгиевича заверяю:

 (С.М. Федина)
19.03.2026 г.


Я, Дивашук Михаил Георгиевич, даю согласие на размещение указанных в отзыве персональных данных на официальном сайте организации и в единой информационной системе, включение указанных в отзыве персональных данных в аттестационное дело и их дальнейшую обработку.