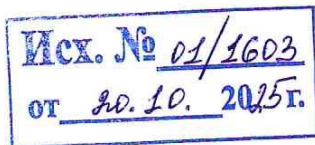


УТВЕРЖДАЮ:

по директора ФГБНУ
«Федеральный исследовательский
центр Всероссийский институт
генетических ресурсов растений
имени Н.И. Вавилова»



Ю.В. Ухатова

20 «октября» 2025г

Отзыв ведущей организации
О диссертационной работе ЕГОРОВОЙ АНАСТАСИИ
АЛЕКСАНДРОВНЫ

«Применение геномного редактирования для получения новых генотипов картофеля с устойчивостью к холодовому осахариванию»,
представляемой на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – Генетика.

Актуальность

Диссертационная работа Егоровой А.Н. направлена на изучение генетических особенностей, обеспечивающих повышенную устойчивость к холодовому осахариванию сортов картофеля, районированных в Российской Федерации. Для перехода на использование отечественного сырья при производстве картофелепродуктов необходимы сорта устойчивые к солодовому осахариванию. В настоящее время в отечественном сорimente число таких специализированных сортов крайне мало. Разработка методов для редактирования генома отечественных сортов картофеля в целях получения растений с улучшенными потребительскими и технологическими свойствами, представляет одно из направлений научных исследований Подпрограммы «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации» Федеральной Научно-технической программы развития сельского хозяйства на 2017-2030 гг. В клубнях картофеля при длительном хранении на низких температурах происходит распад крахмала на редуцирующие сахара, и разработка технологии, направленной на создание сортов с пониженным содержанием редуцирующих сахаров является актуальной. Автором было подтверждено, что нокаут *Pain-1* приводит к устойчивости к холодовому осахариванию и при этом не влияет на ростовые параметры картофеля. Картофель является высокогетерозиготной автотетраплоидной культурой, что требует эффективного редактирования всех четырех аллелей гена *Pain-1* и требует разработки надежной системы геномного редактирования. Актуальность работы связана с разработкой стратегии на основе технологии геномного редактирования для получения растения картофеля с нокаутом всех четырех аллелей гена *Pain-1*, обладающих повышенной устойчивостью к холодовому

осахариванию. Автором проведена оценка возможности использования полученных генотипов картофеля в качестве доноров признака устойчивости к холодовому осахариванию.

Научная новизна

Впервые выявлена генотип-зависимая регуляция холодового осахаривания в клубнях сортов картофеля Никулинский, Невский и 'Симфония'. Впервые на основе векторной системы CasCADE внесены мутации в геном картофеля и получены образцы с различным числом нокаутированных копий гена *Pain-1* для сорта Симфония. Впервые получены растения сорта Симфония с нокаутом всех четырех аллелей *Pain-1*, характеризующиеся снижением накопления редуцирующих сахаров при хранении клубней на холоде до 3 %, а также светлой окраской чипсов. Предположен компенсаторный эффект генов метаболизма сахаров *Sus4* на рост корней в растениях картофеля, нокаутных по гену *Pain-1*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Автором предложена стратегия по получению, на основе геномного редактирования, новых генотипов картофеля, устойчивых к холодовому осахариванию. В результате выполнения диссертационной работы А.А. Егорова получила мутантные линии сорта картофеля Симфония с уменьшенным (до 30-50%) количеством редуцирующих сахаров и светлой окраской чипсов. Показано, что нокаут по гену *Pain-1* не оказывает влияния на параметры мутантов сорта Симфония по сравнению с контрольными растениями. Автором разработана стратегия на основе геномного редактирования, сконструированы генетические конструкции на основе векторной системы CasCADE, с помощью которых возможно получить растения картофеля с нокаутом всех четырех аллелей гена *Pain-1*. Получены генетически отредактированные линии картофеля сорта Симфония, устойчивые к холодовому осахариванию. Проведена гибридизация генетически отредактированных линий с сортом 'Гала' и получены нетрансгенные гибриды F1, которые в перспективе могут быть использованы в селекции новых сортов картофеля.

Личный вклад автора

Основные результаты, изложенные в диссертации получены автором самостоятельно.

Структура и содержание работы

Диссертация Егоровой А.А. изложена на 132 страницах, содержит 6 таблиц, 26 рисунков, 3 приложения, список литературных источников состоит из 155 наименований, из них 145 на английском языке. Работа имеет традиционную структуру и содержит следующие разделы: начинается с введения, изложения целей и задач работы, обзора литературы, результатов и их обсуждения, а также заключения и выводов.

Во введении автор излагает проблему, которой посвящено исследование, отмечает ее актуальность, формулирует цель и задачи исследования,

характеризует научную новизну и практическую значимость, приводит сведения об апробации результатов работы.

Обзор литературы включает 4 раздела. Первый раздел посвящен описанию современных литературных данных об объекте исследования, генетике и основных направлениях селекции картофеля. Особое внимание уделяется сложностям, с которыми сталкивается селекционер при создании новых сортов с заданными свойствами, о барьерах гибридизации, гаметофитной самонесовместимости, ЦМС картофеля и др. Второй раздел обзора литературы посвящен использованию методов биотехнологии и геномного редактирования для получения новых генотипов. Автором рассмотрены технологии редактирования генома, такие как TALENs и CRISPR/Cas9. В следующем разделе рассмотрены различные способы доставки редактирующей конструкции в растение: ПЭГ-опосредованная трансформация протопластов и агробактериальная трансформация. В разделе 1.4. обзора литературы автором изложена проблема холодового осахаривания в клубнях картофеля вследствие накопления редуцирующих сахаров при хранении клубней картофеля при низких температурах. Эта проблема особенно актуальна для сортов, используемых в производстве картофельных чипсов и картофеля фри, которые длительное время сохраняются при температуре ниже 7 °С. Автором выполнен обзор современных литературных данных о генетической регуляции холодового осахаривания, выявлены гены-кандидаты, ассоциированные с данным признаком: *Pain-1* и *Inh2*, а также разработана экспериментальная стратегия получения образцов картофеля с устойчивостью к холодовому осахариванию с применением методов редактирования генома.

По данному разделу имеются небольшие замечания:

1) В обзоре литературы, по нашему мнению, не хватает более подробной информации о различных причинах мужской стерильности сортов картофеля, осложняющих селекционные программы, основанные на межсортовых скрещиваниях.

2) На стр. 18 приведено неправильное указание названия вируса PLRV (*Potato Leafroll Virus*) - речь идет о вирусе скручивания листьев картофеля.

3) Названия зарубежных сортов картофеля даны в переводной версии на русский язык, согласно Международному кодексу номенклатуры культурных растений (МКНКР) (Brickell et al., 2016) в литературе следует приводить оригинальное название сорта.

Глава «Материалы и методы» описывает растительный материал, включенный в анализ: автором выбраны в исследования сорта картофеля, включенные в Госреестр РФ Симфония, Невский, Никулинский. В работе прослеживается комплексный подход к изучению объекта исследования: описаны исследования в полевых условиях СибНИИРС ИЦиГ СО РАН, *in vitro* блок работ с микрорастениями картофеля, анализ содержания сахаров в клубнях картофеля до проведения эксперимента и после проведения эксперимента, современные молекулярно-генетические методы, необходимые для достижения цели работы, в том числе анализ экспрессии генов, выделение и трансформация протопластов картофеля, получение векторов для нокаута целевого гена,

агробактериальная трансформация картофеля, получение и анализ гибридов картофеля. Статистическая обработка подтверждает достоверность и обоснованность результатов исследования.

По данному разделу имеются следующие замечания:

1) В описании методов по блоку *in vitro*: «отобранный для направленного мутагенеза генотип выращивали в условиях *in vitro* на среде MS... рН 5.7–5.8 при температуре 20 ± 2 °С, освещенности 8000 люкс, в условиях длинного дня» необходимо указать, где выращивали микрорастения - это были светостановки или климатические камеры?

2) Анализ содержания сахаров в клубнях картофеля «в момент закладки на хранение и спустя 90 дней хранения измеряли с помощью глюкозооксидазного метода, используя набор «Глюкоза-Ново» («Вектор Бест», Новосибирск)», в то время как «анализ содержания сахаров в генетически отредактированных растениях проводили с помощью набора *Sucrose, D-Fructose and D-Glucose (Megazyme, KSUFRG 04/18)*». С чем связано использование двух разных методов для анализа сахаров?

Глава «Результаты и обсуждение» включает 8 разделов, где автор в логической последовательности излагает экспериментальные данные, которые в полной мере отражают решение всех поставленных задач исследования. В первом разделе обоснован выбор генотипа – сорта Симфония для нокаута гена-мишени. Следующие разделы посвящены созданию мультиплексной конструкции, ее проверки и выполнению нокаута гена *Pain-1*. Благодаря этапу предварительной проверки эффективности конструкции с различными нРНК на протопластах картофеля, автором был успешно выполнен нокаут гена *Pain-1* и получены растения-регенеранты сорта Симфония, которые имели мутации во всех четырех аллелях гена-мишени. Эффективность мутагенеза была проверена с использованием NGS секвенирования. Была проведена оценка содержания сахаров в клубнях картофеля и окраски чипсов, полученных из генно-редактированных линий, которая подтвердила снижение содержания редуцирующих сахаров и более светлую окраску чипсов у редактированных объектов. Были получены и нетрансгенные линии с мутациями в гене *Pain-1*. В заключительном разделе главы автором описаны перспективы использования нетрансгенных линий с устойчивостью к холодовому осахариванию в дальнейшей селекции картофеля.

Основным замечанием к данному разделу является периодически встречающееся отсутствие курсива в названии генов, в том числе в описании векторов и в подписях к рисункам (рис. 11 и 15). Имеется вопрос по таблице 5: с чем связано отсутствие анализа фенотипа у части генно-редактированных линий?

Основные итоги экспериментальной части работы приведены автором в заключении. В результате работы достигнута цель исследования: получена новая информация о холодовом осахаривании в клубнях картофеля, созданы нетрансгенные гибриды с мутантными аллелями гена *Pain-1*, показана возможность успешного применения этих линий в дальнейшей селекции картофеля.

В заключительной части диссертации приведено 6 выводов по данной работе. Выводы обоснованы экспериментальными данными, отражают теоретическую и практическую значимость работы, сформулированы в соответствии с задачами, поставленными для достижения цели исследования.

Оценивая диссертацию и автореферат Егоровой А.А., следует отметить, что все части работы взаимосвязаны, материал изложен в соответствии со строгой логикой, содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации.

Заключение

Таким образом, диссертация Егоровой А.А. представляет собой оригинальную, завершённую научно-квалификационную работу, выполненную на высоком методическом уровне, с применением комплекса методов: от полевых и *in vitro* до современных молекулярно-генетических и биотехнологических методов. Результаты данной работы обладают высокой степенью научной новизны, достоверность результатов не вызывают сомнения, выводы полностью соответствуют результатам эксперимента. Полученные результаты имеют как теоретическое, так и прикладное значение для использования в селекции картофеля. По материалам диссертации автором опубликовано две статьи в рецензируемых журналах и одна глава в монографии. Результаты были представлены на трех российских и международных конференциях.

На основании изложенного считаем, что диссертационная работа Егоровой Анастасии Александровны «Применение геномного редактирования для получения новых генотипов картофеля с устойчивостью к холодовому осахариванию» полностью отвечает требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемых к кандидатским диссертационным работам, а ее автор, Егорова Анастасия Александровна, несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика.

Отзыв заслушан и утвержден на расширенном заседании лаборатории постгеномных исследований ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) протокол от «20» октября 2025 г. № 9.

Кандидат биологических наук (03.02.07 – Генетика)

Ведущий научный сотрудник

Швачко Наталья Альбертовна

и.о. заведующего лабораторией постгеномных исследований ФГБНУ

«Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»

Тел. +7-906-241-14-32, e-mail: n.shvachko@vir.nw.ru

Подпись Швачко Н.А.
УДОСТОВЕРЯЕТСЯ
Зав. канцелярией ВИР

Исходное
Исходное