О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу ***Ставицкой Златы Олеговны «Пути накопления и рециркуляции аскорбиновой кислоты в плодах Malus baccata*** **(L.) Borkh.** ***и ее гибридов F1»,*** *представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по* специальности. ***1.5.21 — физиология и биохимии растений***

Яблоня — одна из основных плодовых культур нашей страны. Яблоки — наиболее распространенные плоды в розничной сети нашей страны и являются доступным источником различных биологически активных соединений для населения. Одним из показателей качества плодов яблони является содержание в них аскорбиновой кислоты, или витамина С. Важная задача современной отечественной селекции плодовых культур, и в частности яблони, заключается в создании новых высокоурожайных районированных сортов с высоким качеством плодов. Такая задача невыполнима без углубленного изучения процессов, влияющих на формирование плодов, и условий для получения плодов высокого качества. Вышесказанное подчеркивает значимость представленной работы.

Актуальность избранной темы. Аскорбиновая кислота один из важнейших биохимических составляющих растительного организма. Аскорбиновая кислота принимает участие в ключевых фазах развития растения и обеспечивает стрессоустойчивость к неблагоприятным факторам среды. Часть накопленной аскорбиновой кислоты сосредотачивается в плодах, кожице и мякоти. Основным путем синтеза аскорбиновой кислоты у большинства растений считается путь Смирнова—Уилера. Однако существуют несколько дополнительных путей, таких как галактуроновый или путь «подхвата» пектина, миоинозитоловый и L-гулозный. Итоговое содержание аскорбиновой кислоты в плодах зависит от активности каждого из путей, что непосредственно связано с экспрессией генов, кодирующих ключевые ферменты синтеза аскорбиновой кислоты (монодегидроаскорбатредуктаза (МДГАР) и дегидроаскорбатредуктаза (ДГАР). Аскорбиновая кислота играет важную роль в поддержании здоровья человека. Для регионов с суровым климатом актуальна задача создания сортов, устойчивых к конкретным условиям выращивания и обладающих при этом высоким качеством плодов. Актуальной тенденцией в селекции плодовых культур является скрещивание *Malus domestica* с дикими аборигенными видами, несущими полезные признаки, к которым относится *M. baccata.*

Краткая характеристика диссертации. Диссертационная работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы по теме диссертации, описания условий проведения экспериментов, материалов и методов исследований, собственно экспериментальной части (результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Объём работы — 137 страниц. Выводы аргументированы 10 таблицами и 36 рисунками. Список литературы включает 213 источников, в том числе 186 — на иностранных языках. Во введении рассматриваются актуальность и степень

разработанности темы, формулируются цели и задачи исследования, освещаются научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. В конце введения автор формулирует положения, выносимые на защиту, указывает степень достоверности работы, описывает апробацию результатов исследования на международных научных конференциях, приводит личный вклад автора и число публикаций.

Глава 1 представляет собой обзор литературных источников по теме исследования и включает описание значения аскорбиновой кислоты для нормальной жизнедеятельности растения. Приводится история изучения биосинтеза аскорбиновой кислоты и характеристика основных путей обмена (синтеза и рециркуляции) АК, основанная на изучении современной научной литературы. Охарактеризованы особенности накопления АК в разных тканях, транспорт АК к различным органам растения. Описаны предшественники синтеза АК (сахара, сорбитол, пектины), связь их метаболизма с развитием плодов яблонь. Рассмотрены история и современная классификация рода *Malus*, особенности введения в культуру в Сибири, перспективы развития пребридинговых исследований. Обзор литературы оставляет хорошее впечатление полнотой охвата темы и глубиной её проработки. Обзор литературы проведен в достаточном объеме и отражает основные сведения по проблеме.

Глава 2 «Материалы и методы» посвящена изложению условий проведения экспериментов, материалов и методов исследований. в отдельные разделы выделены: объект исследования, выделение аскорбиновой кислоты, сахаров сорбитола, пектиновых фракций, ферментов ДГАР, МДГАР, АПО, анализ содержания аскорбиновой кислоты, сахаров, сорбитола методом ВЭЖХ, ГХ-МС, определение содержания пектиновых веществ, степени этерификации пектиновых цепей, активности ферментов ДГАР, МДГАР, АПО, относительной экспрессии генов GGP1, GGP3, DHAR3, MDHAR 1, модельный фидинг опыт с использованием прекурсоров синтеза АК, методы статистической обработки.

Глава 3. В наиболее обширной экспериментальной части диссертации представлены результаты исследований и их обсуждение:

- Содержание АК в тканях на разных стадиях развития плодов;
- Относительная экспрессия генов GGP1, GGP3, DHAR3, MDHAR 1 в тканях на разных стадиях развития плодов;
- Анализ удельной активности ферментов рециклинга АК в ткант на разных стадиях развития плодов;
- Содержание углеводов и пектинов в тканях на разных стадиях развития плодов.
- Модельный эксперимент по инкубации тканей плодов с метаболитами-предшественниками различных путей синтеза АК («фидинг»).

В **заключении** автор подводит итоги проделанной работы и делает обобщение. Выводы основаны на экспериментальных данных, полученных лично автором диссертации. В настоящей работе были изучены особенности накопления АК в плодах *M. baccata, M. domestica* и их гибридов F1.

Охарактеризованы особенности накопления АК в плодах *M. baccata.* Накопление высокого уровня содержания АК на 1-м этапе развития плодов обусловлено экспрессией генов *GGP1, GGP3,* на 2-м и 3-м этапах развития плодов — *MDHAR1* и активностью фермента МДГАР, что, по мнению автора, связано с адаптацией к условиям региона репродукции.

Определены перспективы использования гена *MDHAR1* в маркерной селекции яблони.

Экспериментальный материал, проанализированный автором, весьма обширен. Исследования выполнены с использованием современных методов и технологий. Работа написана хорошим, литературным языком, в ней выдержана логическая нить повествования. Существенных расхождений в содержании автореферата и диссертации мною не выявлено.

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, достоверны и обоснованы:

1. Тщательным анализом отечественной и зарубежной литературы по исследуемой проблеме: 213 источников, из них 186 — на иностранных языках.
2. Современными методами исследования и статистического анализа полученных результатов.
3. Апробацией результатов экспериментальной работы на 5 международных научных и научно-практических конференциях.
4. Публикацией в открытой печати 13 научно-исследовательских работ, в том числе 4 — в журналах, рекомендованных ВАК, 3 — в журналах из базы данных Web of Science и тезисов докладов, представленных на Международных и Всероссийских конференциях с международным участием.

Научная новизна исследований.

Впервые изучена динамика накопления АК в плодах (кожице и мякоти) *M. baccata* и её гибридов F1 на разных стадиях развития: впервые определена относительная экспрессия генов *GGP1, GGP3, MDHAR1, DHAR3,* изучена активность ферментов МДГАР, ДГАР, АПО, динамика накопления растворимых углеводов, сорбитола и пектинов в ходе развития плодов. Впервые установлено, что *M. baccata* имеет отличные от *M. domestica* пути накопления АК в плодах — увеличение содержания АК происходит уже на ранней стадии развития плода и продолжается до стадии зрелости. При этом к зрелости плодов *M. baccata* определяющее значение для накопления АК приобретает работа генов и ферментов системы рециркуляции. Показано, что в результате скрещивания *M. baccata* с *M. domestica* в плодах гибридов происходило снижение содержания АК. Тем не менее, её содержание в плодах таких гибридов превышало аналогичный показатель в плодах *M. domestica,* при этом уменьшалось число возможных метаболических путей синтеза АК и изменялась их локализация в тканях. На основании полученных результатов предложен перспективный ген-кандидат MDHAR1 для маркерной селекции в целях получения плодов яблони с высоким содержанием АК. Необходимо отметить, что эксперимент проведен в условиях открытого грунта Восточной Сибири (экспериментального участка Биоресурсного центра Сибирского

института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской Академии Над (52°16' с. ш., 104°17" в. д.).

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций диссертанта. Теоретическая значимость работы заключается в получении новой фундаментально-научной информации, важной для понимания особенностей путей биосинтеза и рециркуляции АК в тканях плодов *M. baccata* и её гибридов F1 с *M. domestica* при репродукции в почвенно-климатических условиях конкретного региона. Увеличение активности фермента МДГАР, в совокупности с повышенной экспрессией генов *MDHAR1* и *GGP1,* говорит о потенциальной возможности использования полученных данных для маркерной селекции, направленной на получение сортов яблонь с высоким содержанием АК в плодах.

Несмотря на несомненные достоинства данной диссертационной работы, указанные выше, в ней, к сожалению, имеются некоторые неточности и недостатки:

С моей точки зрения, формулировка названия работы, цели и задач была бы более полной, если бы включала, что изучение проводилось в уникальным почвенно-климатических условиях конкретного региона. Это было бы существенным плюсом, учитывая вышеупомянутое влияние АК на устойчивость растений к стрессам среды.

Стр.8 — упомянутые в тексте функциональные характеристики «...как плодовых деревьев, так и самих плодов» требуют дополнительного пояснения: какие именно характеристики принимает во внимание автор.

При изложении практической значимости работы автор делает акцент на «поиске перспективных маркеров для отбора высоковитаминных гибридов яблонь». С учетом того, что самым точным маркером является итоговое значение витамина С в плодах, то формулировка «поиск маркеров, отражающих потенциал плодов тех или иных образцов к накоплению оптимальных количеств витамина С для конкретного региона репродукции культуры» была бы более удачной, т.к. подчеркивала новизну проведенной работы.

Стр. 10, 88 и далее при обсуждении снижения или повышения содержания АК и других показателей необходимо уточнять, по сравнению с какими данными делается такой вывод.

Стр.24 и далее на стр. 46, 64, 113 автор представляет стадии развития плодов, опираясь на данные зарубежных авторов, ссылки присутствуют в тексте. Однако, необходимо соотнести предлагаемую терминологию с используемой в отечественных научных кругах. Так термин «ювенильный период развития» чаще используется в отношении стадий развития сеянцев плодовых деревьев.

Использование неудачных формулировок, несогласованных фраз:

Стр. 10 — «при прохождении стадий развития плодов»;

Стр.40 — «гораздо лучшие вкусовые качества»;

Стр. 7, 8, 24, 60, 92 - 95 — «инкубационной среды», «среда инкубации»;

Стр. 55, 57 — «озвучивали»;

Стр. 97 — «последней реакции миоинозитолового пути», «инкубированных тканях».

Стр. 106, 107 — «нарастить пул АК»;

Стр. 7 —Так вместо «регуляцию активности иммунной системы», в тексте «регуляцию иммунной системы»; «становится важным источником питательных плодов» и т.д.

Стр. 43 — «геном *M. domestica,* увеличивающий содержание АК в плодах, считается ген DHAR»

Раздел «2.2.14. Статистическая обработка данных» — текст стилистически несовершенен и труден для понимания.

Глава «Материалы и методы» имеет недостатки в описании методов, которые автор использовал для изучения своего материала.

Раздел «2.2.2. Анализ содержания аскорбиновой кислоты методом ВЭЖХ», нет описания использованной калибровочной кривой, характеристик детектора и хода анализа (скорости подачи элюента, времени анализа). Судя по описанию, был использован один элюент и изократический тип его подачи.

Раздел «2.2.3. Выделение растворимых сахаров (глюкозы, фруктозы, сорбитола, сахарозы, галактозы) для анализа методом ВЭЖХ» нет описания каким растворителем извлекали целевые соединения, сконцентрированные в картридже. Автор уверен, что целевые соединения были выделены методом ВЭЖХ, а не с помощью препаративной хроматографии.

Раздел «2.2.4. Анализ растворимых сахаров методом ВЭЖХ» не приведены калибровочные кривые (стандартные растворы какой концентрации были использованы для построения кривых). Данные могут быть представлены либо в виде таблиц, либо в виде рисунка.

Раздел «2.2.6. Анализ растворимых сахаров методом ГХ-МС» не указана скорость сканирования масс-спектрометра и время анализа.

Раздел «2.2.7. Выделение пектиновых фракций» не указана температура нагрева для их извлечения.

Раздел «2.2.8. Количественное определение пектиновых веществ» не представлены данные калибровки, с помощью которой были сделаны измерения.

Раздел «2.2.11. Определение активности ферментов ДГАР, МДГАР, АПО» не указаны единицы оценки активности ферментов.

Раздел «2.2.13. Модельный эксперимент инкубации тканей плодов с метаболитами-предшественниками разных путей синтеза АК (фидинг)» методика описана не полностью: отсутствует описание принципов расчета результатов, наличие контроля для оценки полноты использования каждого из прекурсоров аскорбиновой кислоты.

Стр. 47 — При определении сухого веса необходимо отметить, что после высушивания материал остужался без доступа воздуха, т.е. в эксикаторе.

Стр. 49, 51 — пропущены единицы измерения веса.

Стр. 54 не приведены средние многолетние данные температуры воздуха и количества осадков для региона репродукции, что важно для многолетнего

анализа. Тем более, значения аскорбиновой кислоты зависят от воздействия факторов внешней среды, что отмечено автором выше.

Стр. 7, 64 — Автор приводит содержание АК в плодах *M. domestica,* которое затем использует для характеристики уровня содержания АК в образцах плодов, взятых в исследование. Было бы неплохо, если бы автор опирался не только на данные зарубежных, но и отечественных исследователей.

В разделе «Результаты и обсуждение» встречалось неточное или неполное описание результатов.

Стр. 66 — при описании результатов, полученных для сортов Пальметта, Чудное и Раннее Болоняева, не приводятся значения аскорбиновой кислоты, которые автор относит к «низким».

Стр. 68 — при описании результатов 2020 года для сортов Добрыня и Ранетка пурпуровая отмечено высокое содержание АК (до 0,46 мг/г сырого веса). Однако, ранее у данных образцов наблюдалось содержание АК до 0,8 мг/г. В связи с чем нужны пояснения, по сравнению с какими данными содержание АК у Добрыни и Ранетки пурпуровой считается высоким. Отсутствует обсуждение содержания АК в кожице.

Стр.68 — год репродукции указан ошибочно в соответствии с рис. 16,17: 2022 вместо 2021.

Стр. 76 — описание результатов не вполне соответствует приведенному ниже рисунку 23. Сорт Раннее Болоняева упомянул ошибочно исходя из данных рисунка как образец с достоверным увеличением уровня относительной экспрессии гена *MDHAR1* на этапе зрелости плодов.

Стр. 77, 82 — автор делает выводы о том, что ген *MDHAR1* является перспективным геном-кандидатом для использования в маркерной селекции. Однако, по моему мнению, ген *MDHAR1* — перспективный ген-кандидат для продолжения исследования, целью которого станет подтверждение рентабельности использования его в качестве маркера для оценки потенциальной возможности высокого накопления АК в плодах сортов яблонь в условиях конкретного региона репродукции.

Стр. 78 — согласно рисунку 24 плоды отличаются по превалирующей активности ферментов МДГАР и АПО. Следует отметить, идет ли речь о суммарной активности для плодов выборки в целом?

Стр. 79 — при описании активности фермента МДГАР у плодов *M. baccata* следует отметить, что активность фермента снижается и в кожице, и в мякоти плодов, но достоверно только в мякоти (рис. 26).

Стр. 80 — при описании отличий в активности ферментов было бы правильнее отмечать в тексте их достоверность.

Стр. 81 — В тексте отмечено: «Снижение активности АПО также наблюдали в мякоти генотипов *M. domestica* на этапе зрелости плодов». Однако, для сорта Чудное показано достоверное снижение активности фермента АПО в мякоти на 3-м этапе развития плода, Раннее Болоняева — в кожице. Таким образом, необходимо либо конкретизировать, в какой части

плодов наблюдалось снижение активности фермента, либо указать, что снижение наблюдалось для плодов в целом.

Стр. 89 — Неправильно указан генотип. Вместо Пальметта необходимо указать Добрыня согласно рис.34. Диапазон изменчивости степени этерификации пектина для выборки указан неточно (54,0 — 69,25%). Согласно представленным данным, диапазон составляет 52,8 — 69,25%.

Стр. 98 — Автор, описывая модельный эксперимент инкубации тканей плодов с метаболитами-предшественниками различных путей синтеза АК («фидинг»), делает акцент на влияние ночных температур и освещенности на результаты опыта. В этом случае необходимо отразить в разделе «Материалы и методы» соответствующие условия проведения опыта.

Однако, объем выполненных исследований, их научная новизна и значимость для селекции, «перевешивают» отм еченные недостатки. Со всеми поставленными задачами автор справилась. Основные положения, изложенные в диссертации, апробированы на пяти международных научно-практических конференциях, опубликованы в тринадцати печатных работах, из которых 4 — в изданиях, рекомендованных ВАК, 3 — в журналах из базы данных Web of Science и в тезисах докладов.

Считаю, что ***диссертационная работа «Пути накопления и рециркуляции аскорбиновой кислоты в плодах Malus baccata* (L.) Borkh. *и ее гибридов F1», соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней», утверждённым Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013, а её автор - Ставицкая Злата Олеговна — заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 — физиология и биохимии растений***

Официальный оппонент кандидат биологических наук по специальности 1.5.21 «Физиология и биохимия растений», 1.5.20 «Биологические ресурсы», ведущий научный сотрудник отдела биохимии и молекулярной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР). 190031, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, Тел: +7 (812) 312-51-61Факс: +7 (812) 570-47-70, e-mail: t.shelenga@vir.nw.ru, сайт: https://www.vir.nw,

дата 23.03.2026 подпись Шеленга Татьяна Васильевна

Подпись ведущего научного сотрудника отдела биохимии и молекулярной биологии ВИР им. Н.И. Вавилова Шеленга Татьяны Васильевны заверяю:

Директор ВИР, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН Е.К. Хлесткина

«23» 03 2026 г.

Я, Шеленга Татьяна Васильевна, даю согласие на обработку моих персональных данных, связанную с защитой диссертации и оформления аттестационного дела Ставицкой Златы Олеговны

Шеленга Татьяна Васильевна

Подпись Шеленги Т.В.
УДОСТОВЕРЯЕТСЯ
Зав. канцелярией ВИР