

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.218.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ УФИМСКОГО
ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК, МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело №

решение диссертационного совета

от 27 марта 2024 года № 5

О присуждении Шеину Михаилу Юрьевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Роль РНК-интерференции в формировании защитных систем растения пшеницы против возбудителя септориоза *Stagonospora nodorum* Berk» по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки) принята к защите 25 октября 2023 года (протокол заседания № 21) диссертационным советом 24.1.218.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (450054, город Уфа, Проспект Октября, 71, лит. 1Е; сайт организации: <http://ufaras.ru/>). Создание диссертационного совета утверждено приказом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 271/нк от 13 ноября 2018 года (частичные изменения от 30 октября 2020 года № 661/нк, 03 июня 2021 года № 561/нк, 25 января 2022 года № 75/нк, 22 марта 2022 года №257/нк, 14 февраля 2023 года №216/нк).

Текст диссертации размещен на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального

исследовательского центра Российской академии наук 25 сентября 2023 года (<http://ufaras.ru>)

Соискатель Шеин Михаил Юрьевич 23 августа 1994 года рождения, в 2018 году с отличием окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы по направлению 06.04.01 «Биология» (профилю «Генетика») (диплом ВСА 100224 3598732). В период подготовки диссертации с 01.10.2018 по 30.09.2022 годы соискатель Шеин Михаил Юрьевич обучался в очной аспирантуре в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении Уфимский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук по направлению подготовки 06.06.01 – биологические науки, направленность (профиль) 1.5.21. – физиология и биохимия растений. Диплом об окончании аспирантуры № 02240144550 (рег. № 19) от 17.10.2022 и справка об обучении № 75/654.2 от 28 августа 2023 года и Сведения о сданных кандидатских экзаменах по дисциплине «Иностранный язык (английский)» от 18 июня 2019 года, кандидатский экзамен по предмету «История и философия науки» от 25 июня 2019 года, кандидатский экзамен по специальности «Физиология и биохимия растений» от 14 июня 2022 года и кандидатский экзамен по специальности «Генетика» от 20 июня 2023 года прилагаются к личному делу.

С ноября 2022 года по настоящее время Шеин Михаил Юрьевич работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории молекулярной фармакологии и иммунологии Института биохимии и генетики - обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук.

Диссертация выполнена в лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики - обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного

учреждения Уфимский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук.

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор, Максимов Игорь Владимирович, заведующий лабораторией и главный научный сотрудник лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики - обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук.

Официальные оппоненты

Щербань Андрей Борисович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией инновационных средств защиты растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Янбаев Юлай Аглямович – доктор биологических наук, профессор, заведующий Научно-образовательным центром (НОЦ) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Башкирский государственный аграрный университет" дали положительные отзывы на диссертацию (отзывы прилагаются).

Официальный оппонент, доктор биологических наук Щербань Андрей Борисович в своем положительном отзыве, отмечая актуальность, новизну, научную и практическую значимость работы, озвучил замечания, касающиеся терминологии и оформления работы, которые подробно изложены в отзыве и следующие вопросы:

1) Отсутствует переход от общей задачи (изучение РНК-интерференции в системе растение – патоген) к конкретной (изучение этого явления на объекте - мягкая пшеница с использованием в качестве патогена *S. nodorum*). Почему выбрана именно эта система? Какое значение имеют грибные

патогены, включая данный, для этой культуры? Проводились ли подобные работы ранее на злаковых? Какие исследования проводились в вашей лаборатории по изучению защитных систем пшеницы (не обязательно связанных с РНК-интерференции)? В чем преимущество РНК-интерференции перед химическими пестицидами?

2) В обзоре литературы не хватает главы, посвященной другим защитным механизмам растений, кроме РНКи. В частности, не ясна связь РНКи с РАМР- иммунитетом, наверняка есть какие-то данные на этот счет.

3) В главе 3.1 диссертант описывает результат оценки соотношения уровня транскриптов референсных генов мягкой пшеницы *TaRL1* и грибного патогена *S. nodorum SnTUB* в экспериментальных растениях. Однако, в материалах и методах нет соответствующего раздела, хотя некоторые методические подробности хотелось бы знать, в частности, как получали материал для анализа. Использовали ли целые проростки или листовые срезы, сколько растений оценивали и тд.

Официальный оппонент, доктор биологических наук, профессор Янбаев Юлай Аглямович в своем положительном отзыве, отмечая новизну и практическую значимость работы, озвучил следующие замечания и вопросы:

1) Информация в мире о преимуществах защиты растений методами, основанными на использовании явления РНК-интерференции, ограничена, по сравнению с другими классическими методами защиты растений против фитопатогенов. Каково мнение автора работы – насколько данный метод экологически безопаснее и коммерчески выгоднее, по сравнению с использованием химически синтезированных фунгицидов?

2) В приведённом исследовании диссертант сравнивает секвенированные фрагменты гена *TaAgo1* с последовательностями предковых форм генов 7A и 7D из баз данных. Почему не был рассмотрен вариант гена из хромосомы 7B?

3) Как известно, РНК-интерферирующая система эукариот выполняет функцию регуляции активности генов. Автору следовало бы более развернуто

описать, почему, по его мнению, наблюдаемые изменения активности транскрипции генов *Ago* и *DCL* связаны только с активацией защитного ответа растений в ответ на инфицирование возбудителем септориоза? Как видно из описания методов, опыты проводились на проростках в лабораторных условиях. Значит, экспрессионная активность генов РНК могла меняться также по причинам, не зависящим от инфицирования патогеном (например, в ответ на абиотический стресс).

4) В работе рассматривается активность транскрипции генов *Ago* и *DCL*, но не исследованы кодируемые ими белки. Несмотря на то, что диссертационная работа подготовлена по специальности «генетика», в качестве рекомендации для будущих исследований хотелось бы посоветовать автору изучить также этот вопрос.

В отзывах официальных оппонентов дано заключение, что диссертационная работа Шеина Михаила Юрьевича на тему «Роль РНК-интерференции в формировании защитных систем растения пшеницы против возбудителя септориоза *Stagonospora nodorum* Berk» по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки) является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора биологических наук, профессора, главного научного сотрудника Максимова Игоря Владимировича, в которой представлены данные о роли явления РНК-интерференции в формировании защитного ответа растений пшеницы против фитопатогена, а также потенциальные стратегии использования данного процесса. Диссертационная работа Шеина Михаила Юрьевича отвечает критериям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата наук, а ее автор Шеин Михаил Юрьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Соискатель Шеин Михаил Юрьевич дал исчерпывающие ответы на вопросы оппонента д.б.н. Щербаня Андрея Борисовича и д.б.н., профессора Янбаева Юлая Аглямовича, которые полностью удовлетворили оппонентов. Шеин Михаил Юрьевич, при ответе на вопросы оппонента д.б.н. Щербаня Андрея Борисовича, указал на то, что он учтет все озвученные замечания при дальнейшей работе. Соискатель отметил, что в главах, посвященных взаимосвязи СК, ЖК и бактериального штамма *B.subtilis* 26Д приводились ссылки на работы лаборатории, которые были посвящены и другим защитным механизмам, в том числе и связанных с патогенными паттернами. Соискатель указал, что в работе высчитывал среднее значение площади поражения листьев контрастных сортов пшеницы в норме и при предобработке семян индукторами защитного ответа, а затем сравнил полученную динамику с динамикой изменения соотношения накопления транскриптов референсного гена патогена к соответствующему гену пшеницы. Соискатель отметил, что, методически, оценка развития гриба в тканях растений с использованием уровня транскриптов референсных генов патогена и хозяина является более результативным методом по сравнению с визуальной оценкой, поскольку ее можно произвести в более ранние сроки. Соискатель подробно ответил на вопросы оппонента, приводя уточняющие комментарии, которые подробно описаны в стенограмме защиты.

В ответе Шеина Михаила Юрьевича д.б.н. профессору Янбаеву Юлаю Аглямовичу прозвучало, что методы защиты, основанные на явлении РНК-интерференции действительно являются более экологически чистыми по сравнению с химическими фунгицидами, поскольку компоненты данной системы отличаются высокой специфичностью и способны узнавать определенные последовательности, не затрагивая при этом другие организмы в агроценозе. Затем диссертант озвучил основные тенденции, связанные с развитием основанных на явлении РНКи методов, а также перспективы использования этих методов на практике. На этапе составления эксперимента и подбора праймеров Шеин М.Ю. анализировал последовательности в базе

данных «EnsemblPlants». К сожалению, на хромосоме 7В типового сорта *Chinese spring* не наблюдалось просеквенированного фрагмента, который соответствовал бы гену *TaAgo1*. Поэтому использовать для сравнения этот «неидентифицированный» фрагмент в качестве копии на хромосоме 7В диссертант не мог. Диссертант подчеркнул, что о вовлеченности РНК-интерферирующих систем растения и патогена в их противостоянии в патоситсеме свидетельствует обратно-пропорциональная взаимосвязь, которая особенно отчетливо видна на опыте с эндофитными бактериями. При этом диссертант не исключает, что, будучи регуляторами активности других генов, РНКи у обоих организмов может активироваться именно для регуляции активности других генов защитного ответа у растения и агрессивности у гриба. Тем не менее, это не отменяет факта вовлеченности РНКи в сам процесс – лишь открывает простор для дальнейших исследований в данной области. Отвечая на вопрос об исследовании самих белков Ago и DCL, диссертант отметил, что проведения подобного исследования не было возможным. Вариант приобретения антител к белку Ago1 в фирмах «Agrisera» и «Пушинские лаборатории» неоднократно рассматривался в лаборатории. Однако выяснилось, что имеющиеся в наличии антитела имели очень высокую цену и, будучи рассчитанными на растение арабидопсис - не работали на пшенице.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения РАН (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН) в своем положительном отзыве, составленном ведущим научным сотрудником лаборатории биотехнологии, кандидатом биологических наук Киселевым Константином Вадимовичем, и утвержденным доктором биологических наук, членом-корреспондентом РАН, директором Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты восточной Азии» Дальневосточного отделения РАН (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН),

Гончаровым Андреем Анатольевичем, указала, что полученные диссертантом Шеиным М.Ю. результаты имеют фундаментальное и практическое значение и важны для развития представления о механизме работы основных генов РНК-интерференции на примере растения пшеницы *T. aestivum* и патогенного гриба *S. nodorum*. С практической точки зрения данная диссертационная работа интересна тем, что в ней показана вовлеченность системы РНК-интерференции в устойчивости растений пшеницы к патогенным грибам. Показана возможность диагностики устойчивости растений пшеницы к патогену с использованием соотношения генов домашнего хозяйства партнеров патогенной системы.

При изучении и коллективном обсуждении диссертационной работы М.Ю. Шеина были сформулированы следующие вопросы:

1) Суммируя в общем все результаты, можно сказать, что авторы наблюдали активацию транскрипции генов РНК-интерференции у чувствительного сорта пшеницы *T. aestivum* под воздействием патогенного гриба *S. nodorum*. У гриба *S. nodorum* транскрипция генов РНК-интерференции возрастала при выращивании с семенами пшеницы. Бактерия *Bacillus subtilis* 26Д сдерживала работу РНК-интерференции у грибов, но стимулировала у пшеницы.

Возникают следующие вопросы и замечания:

- Почему не наблюдалось сильно активации транскрипции генов РНК-интерференции у устойчивого штамма пшеницы при инфицировании патогенным грибом?

- Увеличение или уменьшение транскрипции исследуемых генов РНК-интерференции будет ли сопровождено уменьшением/увеличением количества или состава фракции малых РНК в исследуемых растениях пшеницы? Ответить на этот вопрос помогло бы полногеномное секвенирование фракции малых РНК.

2) Изучение работы генов основывается на данных полуколичественной ПЦР и ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР-РВ), поэтому в

материалах и методах и результатах важно указать несколько важных моментов:

а) Из представленных методов не понятно, как проверяли отсутствие контаминации ДНК?

б) В представленных фотографиях гель электрофоретического разделения продуктов генов (например, Рис. 4, 10) необходимо предоставить так же разделение ПЦР продуктов генов домашнего хозяйства, чтобы показать, что нагрузка кДНК была примерно одинаковой во всех пробах. Более того, представить маркеры молекулярных весов ДНК, чтобы узнать примерный вес представленных продуктов.

в) Для нормализации данных желательно использовать минимум два гена домашнего хозяйства для каждого используемого организма.

г) Для используемых генов у пшеницы *T. aestivum* (*TaRL1*) и гриба *S. nodorum* (*SnTub(β)*) необходимо предоставить информацию о стабильности этих генов при использовании их для анализа экспрессии генов.

3) Желательно в данных по анализу транскрипции анализируемых генов предоставить статистическую обработку, поскольку из представленных рисунков не всегда понятно, являются ли наблюдаемые отличия статистически значимыми.

4) Авторы уделили довольно много усилий для получения последовательности гена *TaAGO1* в используемых сортах пшеницы, но смогли получить только часть белок кодирующей последовательности гена. Возможно, это из-за того, что авторы в качестве матрицы использовали ДНК. С кДНК это сделать было бы проще.

Также в отзыве были озвучены замечания, которые подробно изложены в отзыве.

Отвечая на вопросы ведущей организации, Шеин М.Ю. отметил, что отсутствие выраженной активации транскрипции генов РНК-интерференции у устойчивого сорта пшеницы связано с активацией у сорта других защитных механизмов на ранних этапах патогенеза. Диссертант учел рекомендацию о

секвенирование малых РНК при планировании будущих опытов. Он предположил, что увеличение активности генов *Ago* и *DCL* действительно будет сопровождаться и увеличением фракции малых РНК. Однако для ответа на этот вопрос необходимо исследовать механизм РНКи в совокупности с другими системами растения и патогена. Диссертант отметил, что для проверки отсутствия контаминации он ориентировались на показания спектрофотометра в соответствии с прилагающимся к нему протоколом и оптимальными показателями для РНК и ДНК. На этапе проведения ПЦР в реальном времени присутствовали отрицательный и положительный контроли. Диссертант учел замечание, касающиеся молекулярных весов и отметил, что результаты из программы «TotalLab» были получены на ранних этапах работы и в дальнейшем проверены и подтверждены данными РТ-ПЦР. Он указал использованное программное обеспечение в главе 2.7 «Статистическая обработка результатов» и привел ссылки на статьи, в которых использовались референсные гены исследуемых в диссертационной работе организмов. Диссертант также отметил, что, возможно, в какой-то степени, использование кДНК вместо ДНК могло бы облегчить ему анализ последовательности части гена *TaAgo1*. Однако, для сравнения просеквенированных фрагментов с последовательностями из баз данных недостаточно было сравнить кодирующие области, а возникшие в ходе секвенирования сложности были, в большей степени, связаны «накладыванием» различных нуклеотидов с разных копий гена друг на друга

Соискатель дал ответы на замечания, которые подробно отражены в стенограмме защиты.

Диссертационная работа и отзыв обсуждены и одобрены на заседании лаборатории биотехнологии, протокол № 1 от 19 февраля 2024 года.

В заключении отмечается, что по актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа «Роль РНК-интерференции в формировании защитных систем растения пшеницы против возбудителя септориоза *Stagonospora nodorum* Berk» отвечает требованиям, предъявляемой

к кандидатским диссертациям в пунктах 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 23.09.2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор Шеин Михаил Юрьевича заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика (биологические науки).

Соискатель имеет 17 печатных работ, в том числе 6 статей в журналах, входящих в перечень ВАК из них 4 индексируемых в международных базах Scopus и Web of Science. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени кандидата наук работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. Публикации посвящены изучению роли генов, кодирующих белки - компоненты механизма РНК-интерференции у растений пшеницы и фитопатогена *S. nodorum* в формировании защитного ответа растений против инфицирования в различных условиях.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Maksimov I.V. Mechanisms of Plant Tolerance to RNA Viruses Induced by Plant-Growth- Promoting Microorganisms / I.V. Maksimov, A.V. Sorokan', G.F. Burkhanova, S.V. Veselova, V.Yu. Alekseev, M.Yu. Shein, A.M. Avalbaev, P.D. Dhaware, G.T. Mehetre, B.P. Singh, R.M. Khairullin // Plants 2019. - V.8. - Art. – P. 575. - DOI: 10.3390/plants8120575. (WoS, SCOPUS);

2. Максимов И.В. РНК-интерференция в защитных системах растений / И.В. Максимов, М.Ю. Шеин, Г.Ф. Бурханова // Физиология растений. – 2021. - том 68. - No 4.- с. 356-370. - DOI: 10.31857/S0015330321030131. (РИНЦ, RSCI, ВАК). - Перевод: Maksimov, I.V., Shein, M.Y., Burkhanova, G.F. RNA Interference in Plant Defense Systems. - Russ. J. Plant Physiol. 2021. - V. 68. - P. 613–625. - (ВАК, РИНЦ, WoS, SCOPUS);

3. Шеин М. Ю. Изменение транскрипционной активности генов *TAAGO2* и *TAAGO4* в растениях пшеницы при инфицировании грибом *Stagonospora nodorum* Berk / М. Ю. Шеин, Г. Ф. Бурханова, А. Ю. Мерзлякова, И. В.

Максимов // Труды Кубанского государственного аграрного университета. - 2021. - выпуск 92.- С. 196-200. - DOI: 10.21515/1999-1703-92-196-200. (ВАК, РИНЦ);

4. Максимов И. В. Эндифиты и защита растений от биотического стресса: перспективы создания биопрепаратов нового поколения / И. В. Максимов, С. В. Веселова, М. Ю. Шеин, Р. М. Хайруллин // Труды Кубанского государственного аграрного университета. - 2022. - № 5 (98). - С. 98-104. DOI: 10.21515/1999-1703-98-98-104. (ВАК, РИНЦ);

5. Максимов И. В. РНК-интерференция в защите растений от грибной и оомицетной инфекции / И. В. Максимов, М. Ю. Шеин, Г. Ф. Бурханова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2023. - Т. 59. - № 3. - С. 219 – 234. - DOI: 10.31857/S0555109923030133. (РИНЦ, RSCI, ВАК). - Перевод: Maksimov I.V., Shein M.Y., Burkhanova G.F. RNA Interference in Plant Protection from Fungal and Oomycete Infection // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2022. – Т. 58. – №. Suppl 1. – P. S16 - S31. (ВАК, РИНЦ, WoS, SCOPUS);

6. Шеин М.Ю. Влияние салициловой и жасмоновой кислот на активность генов *SnAGO* гриба *Stagonospora nodorum* Berk. в культуре и при инфицировании растений пшеницы / М.Ю. Шеин, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2023. - Т.27. - №8. - С. 1000-1009; DOI: 10.18699/VJGB-23-115. (ВАК, РИНЦ, WoS, SCOPUS).

На диссертацию и автореферат поступило 6 отзывов:

1. Отзыв доктора биологических наук, профессор кафедры агрономии, селекции и семеноводства Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный аграрный университет» им. П.А. Столыпина (ФГБОУ ВО Омский ГАУ), **Плотниковой Людмилы Яковлевны**. Отзыв положительный, без замечаний.
2. Отзыв кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника, отдела генетики ВИР Федерального государственного бюджетного научного

учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР), **Колесовой Марии Анатольевны**. Отзыв положительный, без замечаний.

3. Отзыв кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», **Бурьгина Геннадия Леонидовича**. Отзыв положительный, с тремя вопросами и замечаниями технического характера: 1) Каков вклад выявленных различий в активности транскрипции генов *Ago* и *DCL*, а также в структуре белка *TaAGO1* на устойчивость мягкой пшеницы к септориозу? 2) Какие технологические приёмы планируются при создании биопрепаратов, содержащие молекулы РНК? И за счёт чего такие биопрепараты могли бы быть эффективны для борьбы с септориозом? 3) Чем представлена четвертичная структура белка *TaAGO1*? Насколько, по мнению автора, изменения в конфигурации участка белка с высокой неупорядоченностью структуры могут повлиять на его функциональную активность?

4. Отзыв кандидата биологических наук, заведующей сектором функциональной генетики злаков Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, **Шоевой Олеси Юрьевны**. Отзыв положительный, с двумя вопросами: 1) Возможен ли альтернативный сплайсинг для гена *TaAgo1*? 2) Как вы можете объяснить отсутствие специфичного ПЦР-фрагмента при использовании праймеров A1-A4?

5. Отзыв кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории экологической физиологии растений Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, **Шелякина Михаила Анатольевича**. Отзыв положительный, с тремя вопросами: 1) Какими статистическими методами пользовались при оценке достоверности различий в уровне экспрессии генов между различными экспериментальными вариантами? 2) Почему для секвенирования и биоинформационного анализа был выбран именно ген *TaAgo1*? 3) С чем может быть связано то, что воздействие СК и ЖК

усиливало экспрессию исследуемых генов и у пшеницы, и у патогена, но при этом степень поражения листьев патогеном при обработке СК и ЖК была значительно ниже?

6. Отзыв кандидата химических наук, старшего научного сотрудника лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ГНЦ ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), **Рогожина Евгения Александровича**. Отзыв положительный, с вопросами и рекомендациями: 1) По тексту в ряде случаев используется термин «заболевание растений», что является не совсем корректным. Более правильно применять понятие «болезнь растения». 2) Фраза «некоторые эндофиты обладают комплексной инсектицидной и фунгистатической активностью» - очевидно, что многие штаммы-антагонисты из числа видов рода *Bacillus* синтезируют метаболиты с антибиотической активностью, иными словами, они способны в реализации фунгицидных свойств, что проявляется при применении биопрепаратов на их основе. 3) А какая ситуация с самими белками-продуктами экспрессии исследованных генов *Ago* и *DCL*? Была ли проведена их визуализация? Чем можно объяснить различия в активности транскрипции, между *Ago* и *DCL*?

"Соискатель Шеин Михаил Юрьевич ответил на все вопросы и замечания, указанные в отзывах на автореферат диссертации. Отвечая на вопросы **Бурыгина Геннадия Леонидовича**, соискатель отметил, что изученные гены *Ago* и *DCL* принимают непосредственное участие во взаимодействии растения и фитопатогена. Обнаруженная аминокислотная замена была идентифицирована у растений сорта Жница впервые. По мнению диссертанта, найденная замена аминокислотного остатка может оказывать выраженный эффект на активность белка, поскольку находится близко к PIWI домену. Основными преимуществами методов защиты растений, основанных на явлении РНКи являются их специфическая направленность и экологическая безопасность. Отвечая на вопрос **Шоевой Олеси Юрьевны** об альтернативном сплайсинге, диссертант согласился, что это возможно. В свою

очередь отсутствие специфических фрагментов при использовании праймеров A1-A4 диссертант объяснил особенностями структуры доменов белка, кодируемого геном *TaAgo1*. Отвечая на вопросы **Шелякина Михаила Анатольевича**, диссертант перечислил использованные при статистической обработке методы и программы: попарное сравнение уровня транскриптов оценивалось по стандартному критерию Стьюдента. Далее полученные данные анализировались в программе STATISTICA при помощи апостериорного критерия Дункана в ANOVO. Выбор гена *AGO1* был обусловлен возможностью сравнивать структуру этого гена с имеющейся в базах данных информацией. Наблюдаемая динамика развития заболевания под действием СК и ЖК на фоне сходной динамики активности транскрипции генов *Ago* и *DCL* объясняется тем, что растения пшеницы были иммунизированы индукторами предварительно, а потом инфицированы патогеном. Отвечая на вопросы, **Рогожина Евгения Александровича**, диссертант учел все указанные замечания. Он отметил, что визуализация самих белков Ago и DCL в работе не проводилось. Термин «предположительных» в рисунке 10 был использован потому, что получаемую аминокислотную последовательность на основании последовательности нуклеотидов рассчитывала программа MEGA11. В тексте диссертации указано, что аминокислоты Пролин и Серин имеют различную полярность, что, согласно полученной в «SWISS-MODEL» модели, оказывает влияние на пространственную конформацию участка белка.

Во всех отзывах на автореферат отмечается, что работа Шеина Михаила Юрьевича является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи, имеющей важное значение для биологической науки. Отмечено, что диссертационная работа выполнена в полном объеме на высоком научном и методическом уровне, выводы диссертации достоверны и полностью отражают поставленные задачи. Во всех отзывах указано, что диссертационная работа отвечает критериям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней»,

утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата наук, а ее автор Шеин Михаил Юрьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки) (отзывы прилагаются).

Выбор официальных оппонентов обосновывается следующим:

Щербань Андрей Борисович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией инновационных средств защиты растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), является высококвалифицированным специалистом в области изучения генетики, геномики, протеомики и транскриптомики растений, модификации генома у культурных растений, а также роли генов культурных растений при формировании ответа на биотический и абиотический стресс, что предполагает возможность всестороннего анализа оппонируемой работы.

Янбаев Юлай Аглямич – доктор биологических наук, профессор, заведующий Научно-образовательным центром (НОЦ) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Башкирский государственный аграрный университет", является высококвалифицированным специалистом в области изучения генетики растений, популяционной и экологической генетики, что предполагает возможность всестороннего анализа оппонируемой работы.

Оппоненты имеют соответствующие публикации в журналах из Перечня ВАК и дали свое согласие быть оппонентами диссертационной работы Шеина Михаила Юрьевича.

Выбор ведущей организации обусловлен тем, что в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федерального научного

центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН) проводят научные исследования по направлениям, соответствующим теме диссертационного исследования в области комплексных исследований новых подходов для индукции РНК-интерференции у растений. Результаты работ сотрудников данного учреждения широко известны как в российских, так и международных научных кругах.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

предложена возможность использования показателя уровня транскриптов референсного гена патогена (*SnTUB*) по отношению к уровню транскриптов соответствующего гена растения-хозяина (*TaRLI*) для ранней оценки устойчивости сортов пшеницы к возбудителю септориоза *S. nodorum*, а также оценки иммунизирующего эффекта на растения низкомолекулярных индукторов фитоиммунитета различной природы (СК и ЖК) и эндофитных бактерий (*B. subtilis* 26Д);

показано, что ответ генов *Ago* и *DCL* мягкой пшеницы на инфицирование возбудителем септориоза *S. nodorum* предполагает активное участие этих генов в формировании защитной системы растения пшеницы;

установлено, что повышение активности транскрипции генов семейств *AGO* и *DCL* у мягкой пшеницы и снижение активности этих же генов у патогенного гриба в условиях инокуляции растений бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д, предполагает вовлечение эндофита в регуляцию явления РНКи в качестве защитного механизма против патогена;

доказано влияние сигнальных молекул индуцирующих фитоиммунитет (СК и ЖК) и эндофитных бактерий (*B. subtilis* 26Д) на активность транскрипции генов *SnAGO1* и *SnAGO2* у патогенного гриба *S. nodorum* при инфицировании контрастных по устойчивости к септориозу сортов мягкой пшеницы;

показано, что высокая гомология нуклеотидной последовательности кДНК консервативного домена PIWI гена *TaAgol* у исследованных сортов пшеницы с аналогичной последовательностью у гена *AtAgol* эгилопса *Aegilops tauchii*, потенциального донора генома D, а также данные филогенетического анализа, свидетельствуют о ключевой роли хромосомы 7D в геномной реализации экспрессии этого гена у мягкой пшеницы в ответ на инфицирование фитопатогенным грибом *S. nodorum*;

обнаружены различия между сортами в структуре фрагментов ДНК гена, кодирующего белок AGO1, проявляющимися, в последствии, в замене остатка аминокислоты Р на остаток аминокислоты S в положении 855 в аминокислотной последовательности и, соответственно, в изменениях структуры белковой молекулы.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

выявлена взаимосвязь генов компонентов РНК-интерференции у растений пшеницы и патогенного гриба *S. nodorum*;

показано влияние индукторов защитного ответа – растворов СК, ЖК и штамма *B. subtilis* 26Д на активность генов компонентов РНК-интерференции в различных условиях;

обнаружена ведущая к замене аминокислоты однонуклеотидная замена (Р-855-S) в последовательности гена *TaAgol* у восприимчивого сорта пшеницы Жница;

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

предложен метод оценки степени поражения растений пшеницы на ранних этапах патогенеза посредством оценки соотношения уровня транскриптов референсных генов;

выявлены различия в активности накопления транскриптов генов РНК-интерференции у восприимчивого и устойчивого сортов пшеницы в различных условиях;

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

для экспериментальных работ – достоверность полученных результатов подтверждается воспроизводимостью и многочисленностью проведённых экспериментов, а также наличием положительных и отрицательных контролей, использованием современного научного оборудования, валидированных методов и анализом результатов с применением статистических методов.;

теория работы основана на анализе существенного объема научной литературы по изучаемой тематике работы, на известных данных и фактах, согласующихся с ранее опубликованными материалами по теме диссертации;

идея базируется на анализе современной отечественной и зарубежной литературы по изучению роли РНК-интерференции в иммунитете растений;

использованы современные данные научно-исследовательских работ, связанные с темой диссертации и опубликованные в рецензируемых научных изданиях;

установлена сопоставимость полученных результатов настоящего исследования с данными, опубликованными в более ранних работах зарубежных и отечественных научных авторов. Вместе с тем, в проведенном исследовании получены новые приоритетные результаты о роли генов *Ago* и *DCL* при формировании защитного ответа в патосистеме «растение-гриб»;

использованы современные методы лабораторных исследований, а также методы статистической обработки результатов. Для интерпретации результатов привлечены сведения из многих литературных источников.

Личный вклад соискателя заключается в непосредственном участии в выполнении всех этапов исследования. Определение темы диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научным руководителем - д.б.н. Максимовым И. В. Разработка методологических подходов к решению поставленных задач, непосредственное проведение экспериментов по исследованию активности транскрипции генов системы РНК-интерференции, а также анализ и обсуждение полученных результатов и их оформление в виде научных публикаций и докладов проведены автором лично, либо при непосредственном участии. Подготовка рукописи настоящей диссертационной работы и автореферата лично проводились автором.

В ходе защиты диссертации критические замечания высказаны не были, заданы вопросы уточняющего и конкретизирующего характера. Соискатель Шеин Михаил Юрьевич ответил на все вопросы в ходе заседания.

На заседании 27 марта 2024 года Диссертационный совет пришел к выводу, что совокупность защищаемых положений позволяет заключить, что диссертация Шеина Михаила Юрьевича «Роль РНК-интерференции в формировании защитных систем растения пшеницы против возбудителя септориоза *Stagonospora nodorum* Berk» имеет большое научное и практическое значение для решения ряда фундаментальных проблем, таких как определения роли компонентов РНК-интерферирующей системы и их использование при разработке новых экологически-безопасных методов повышения устойчивости культурных растений к фитопатогенам. Диссертация является цельным и законченным научным исследованием, обладающим внутренним единством изложения, выводы полностью соответствуют поставленным задачам и подчинены единству концепции диссертационного исследования.

Диссертационная работа Шеина Михаила Юрьевича представляет собой научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям п. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней»

утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

На заседании 27 марта 2024 года диссертационный совет 24.1.218.01 принял решение присудить Шеину Михаилу Юрьевичу ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 5 докторов наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки), участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 16, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета 24.1.218.01, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАО	  Хуснутдинова Эльза Камилевна
Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.218.01, д.б.н., доцент	 / Корытина Гульназ Фаритовна
	«27» марта 2024 года