

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОРАЗНООБРАЗИЯ
НАЗЕМНОЙ БИОТЫ ВОСТОЧНОЙ АЗИИ»
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ФНЦ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ДВО РАН)

690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159

тел.: (423) 231-04-10, факс: 231-01-93, e-mail: info@biosoil.ru

16147/ 128

21.02.2024

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН

чл.-корр. РАН



Гончаров Андрей Анатольевич

21 февраля 2024 года

Отзыв ведущей организации на диссертационную работу

Шейна Михаила Юрьевича

«Роль РНК-интерференции в формировании защитных систем растения пшеницы против возбудителя септориоза *Stagonospora nodorum* BERK», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – Генетика (биологические науки)

Актуальность темы выполненной работы

Развитие и размножение фитопатогенов приводит к большим потерям в урожайности сельскохозяйственных культур, в том числе пшеницы *Triticum aestivum* – одной их главной сельскохозяйственной культуры, выращиваемой в России. Сегодня наиболее распространенным подходом к защите растений является использование химических пестицидов, но такие подходы загрязняют природные экосистемы, способствуют развитию различных заболеваний у человека и приводят к появлению устойчивых к пестицидам более агрессивных форм патогенов.

Использование генетически-модифицированных организмов в сельском хозяйстве запрещено на территории России, поэтому в этих условиях перспективными способами повышения устойчивости растений является

разработка технологий регулирования работы генов растений с помощью РНК-интерференции – новой современной технологии.

Оценка работы компонентов РНК-интерферирующей системы является одной из наиболее бурно развивающихся областей молекулярной биологии и геномики в перспективе способствующей не только пониманию механизмов работы генома живых организмов, но и позволяющей использовать полученные знания в практических целях в качестве, например, эффективных защитных спрей-препаратов, быстро влияющих на работу целевых генов растений и патогенов на уровне транскрипции и трансляции. Но механизмы и особенности применения РНК-интерференции на сельскохозяйственных растениях слабо изучены, поэтому исследования в этой области высоко интересны.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов, сформулированных в диссертации

Научная новизна диссертационной работы заключается в исследовании особенности работы основных генов РНК-интерференции на примере чувствительных и устойчивых к патогенам сортов пшеницы и широко распространённого патогенного гриба *Stagonospora nodorum*, возбудителя септориоза.

Представленные результаты и выводы являются уникальными и несут существенное научное значение, доказательством данных слов могут служить публикации в рецензируемых изданиях.

Достоверность результатов исследования

Полученные научные результаты и выводы Шеина Михаила Юрьевича являются обоснованными и достоверными. Это обусловлено адекватностью выбранных методических подходов, правильностью использования этих методов, правильным отбором выборки, систематизацией полученных данных.

Работа выполнена на хорошем методическом уровне. Основные результаты диссертации опубликованы в иностранных и отечественных реферируемых изданиях и доложены на конференциях.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертационной работы. Все использованные в работе данные получены самим автором или при непосредственном участии автора, как на этапе постановки цели и задач, разработки методических подходов и их выполнения, так и при проведении исследований, обработке, анализе и обобщении полученных результатов для написания и оформления рукописи.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Диссертационная работа Шеина Михаила Юрьевича содержит фундаментальные и практические результаты. Полученные соискателем результаты важны для развития фундаментальных представлений о работе основных генов РНК-интерференции у растений на примере пшеницы *T. aestivum* и у грибов на примере *S. nodorum*.

С практической точки зрения данная работа интересна тем, что в ней показана вовлеченность системы РНК-интерференции в устойчивости растений пшеницы к патогенным грибам. Более того, показана возможность диагностики устойчивости растений пшеницы к патогену с использованием соотношения генов домашнего хозяйства партнеров патогенной системы.

Общая характеристика работы

Рукопись диссертации изложена на 150 страницах, состоит из Введения, глав Обзора литературы, Материалов и методов исследования, Результатов исследования и их обсуждения и Заключения. В диссертационной работе так же имеются выводы, перечень сокращений и список литературы. Иллюстративный материал содержит 9 таблицы и 31 рисунок. Обзор литературы написан подробно и четко.

Содержание автореферата отражает защищаемые положения диссертации. По теме диссертации опубликовано 17 работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Для реализации поставленных задач использован большой объем экспериментального материала, проведено множество экспериментов по исследованию транскрипции основных представителей РНК-интерференции у растений на примере пшеницы *T. aestivum* и у грибов на примере *S. nodorum*. Показаны и обсуждены особенности изменения экспрессии генов РНК-интерференции при инфицировании патогенными грибами и обработке стрессовыми гормонами растений.

В целом диссертационное исследование Шеина М.Ю. заслуживает положительной оценки, так как выполнена большая по объему, трудоемкая, грамотно в научном смысле построенная работа, завершенная важными в научном и практическом отношении результатами.

Вопросы к работе и замечания

В ходе прочтения диссертационной работы возник ряд предложений, вопросов и замечаний, которые представлены ниже:

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.

Возникает несколько вопросов, например:

- Почему не наблюдалось сильной 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 геля 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 ПЦР продуктов.

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

г) Для используемых генов у пшеницы *T. aestivum* (TaRLI) 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.

Небольшие замечания:

5) Стр. 56: «этанолом для удаления следов фенола, подсушивали и растворяли в минимальном объеме 1 x TE буфера»

- Непонятно, что означает в минимальном объеме?

6) Стр. 57: «2пМ каждого праймера, по 200 мкМ дАТФ, дЦТФ, дТТФ, дГТФ и 1 е.а. Таq-полимеразы».

- Необходимо указать фирму производитель указанных реактивов.

7) Стр. 56, в пункте 2.6.3. авторы говорят об использовании M-MuLV обратной транскриптазы фирмы Синтол, но через предложение говорят об использовании M-MuLV фирмы Fermentas. Может все же Синтол, поскольку с 2010 года Fermentas является частью Thermo Fisher Scientific.

Заключение

Диссертационная работа Шеина Михаила Юрьевича «Роль РНК-интерференции в формировании защитных систем растения пшеницы против возбудителя септориоза *Stagonospora nodorum* BERK», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – Генетика (биологические науки) является законченной научно-квалификационной работой, в которой исследована работа некоторых генов системы РНК-интерференции при инфицировании патогенными грибами и показано положительное влияние на инфицированную пшеницу штамма *B. subtilis* 26Д, которое связано со сдерживанием генов РНК-интерференции у используемого патогенного гриба *S. nodorum*.

По актуальности темы, научному уровню, теоретической и практической значимости результатов диссертация отвечает требованиям п. 9-12,14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 23.09.2013 г. № 842, а ее автор Шеин Михаил Юрьевич заслуживает присуждения ему

ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – Генетика (биологические науки).

Диссертационная работа Шеина М.Ю. и отзыв были обсуждены и одобрены на заседании лаборатории биотехнологии, протокол № 01 от 19 февраля 2024 года.


Отзыв составлен ведущим научным сотрудником лаборатории биотехнологии, к.б.н. по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), Киселевым Константином Вадимовичем.



Киселев Константин Вадимович

21 февраля 2024 года



Подпись Киселева К.В. заверяю
Ученый секретарь
ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН

к.б.н. А.П. Тюнин

Сведения о составителе отзыва:

Киселев Константин Вадимович,
к.б.н. по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии),

Должность: ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОРАЗНООБРАЗИЯ
НАЗЕМНОЙ БИОТЫ ВОСТОЧНОЙ АЗИИ» ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ФНЦ
БИОРАЗНООБРАЗИЯ ДВО РАН),

Адрес организации: 690022, г. Владивосток, проспект 100-летия
Владивостока, 159.

Тел.: (423) 231-04-10, факс: 231-01-93, e-mail: info@biosoil.ru, сайт
организации: <https://biosoil.ru>

E-mail: kiselev@biosoil.ru; Тел.: +79243204604