

ОТЗЫВ

**официального оппонента Щербаня Андрея Борисовича
на диссертационную работу Шеина Михаила Юрьевича «Роль РНК-
интерференции в формировании защитных систем растения пшеницы
против возбудителя септориоза *Stagonospora nodorum* Berk.»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 1.5.7 – генетика (биологические науки).**

Актуальность темы исследования.

Диссертационная работа Шеина М.Ю. посвящена важной задаче: изучению механизмов РНК-интерференции для защиты растений от биотических факторов, включая грибные патогены. Данные механизмы пока слабо изучены у покрытосеменных растений. Актуальность работы обусловлена тем, что в последние годы необходимость повышения продуктивности сельскохозяйственных культур требует разработки новых, экологически-безопасных средств защиты от патогенов, а именно: биопестицидов, которые являются альтернативой химическим пестицидам. Последние, как известно, зачастую являются высокотоксичными, поражают не только вредные, но и полезные организмы, наносят вред здоровью человека. Методы РНК-интерференции среди биопестицидов занимают особое место, т.к. высоко-специфичны против конкретных патогенов, не влияют на экологию и здоровье человека и не относятся к запрещенным во многих странах генно-инженерным методам. В работе впервые проводится анализ экспрессии генов системы РНК-интерференции не только растения- хозяина, но и гриба-патогена как в нативных условиях, так и под воздействием экзогенных индукторов устойчивости - растительных гормонов, а также под влиянием эндофитных бактерий рода *Bacillus*.

Научная новизна исследования и практическая значимость.

В результате проделанной работы автором получен ряд важных научных результатов, в том числе:

1) Выявлено увеличение уровня транскрипции генов мягкой пшеницы, кодирующих основные белки системы РНК-интерференции семейств *AGO* и *DCL*, в ответ на инфицирование возбудителем септориоза, что предполагает активное участие этих генов в формировании защитной системы растения пшеницы;

2) Впервые показано воздействие иммунной системы растений пшеницы на активность транскрипции генов *SnAGO1* и *SnAGO2* патогенного гриба с использованием контрастных по устойчивости к патогену сортов пшеницы, и установлен различный уровень экспрессии этих генов у восприимчивого и устойчивого сортов, что предполагает активное влияние системы защиты растений на уровень экспрессии указанных генов;

3) Обнаружена модуляция транскрипции генов семейств *AGO* и *DCL* у мягкой пшеницы и патогенного гриба в условиях инокуляции растений бактериальным штаммом *B. subtilis*, что предполагает вовлечение эндофита в регуляцию РНК-интерференции в качестве защитного механизма против патогена;

4) Показана определяющая роль 7D-гомеолога гена *AGO1* в экспрессии этого гена у мягкой пшеницы в ответ на инфицирование фитопатогеном и проведено его секвенирование у устойчивого и восприимчивого сортов мягкой пшеницы, которое позволило обнаружить различия в структуре, потенциально способные оказывать влияние на функционирование белка.

Выводы достоверны и обоснованы. Новизна результатов не вызывает сомнений, также как их значимость, не только теоретическая, но и практическая, поскольку данная работа закладывает основу для разработки новых биопрепаратов против возбудителя септориоза, и их использования для защиты пшеницы и других злаковых.

Обоснованность и достоверность результатов

В целом, работа Шеина М.Ю. производит впечатление грамотного исследования с использованием широкого спектра методов фитопатологии и молекулярной генетики, таких как: работа с культурами гриба,

инфицирование и фитопатологический анализ растений, выделение ДНК/РНК, анализ транскрипции генов с помощью ПЦР в реальном времени, секвенирование, функциональный анализ последовательностей белков и др. Выводы достоверны и обоснованы.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

Имеется более чем достаточное для кандидатской диссертации количество публикаций, включая 6 статей в журналах, входящих в перечень ВАК и индексируемых в международных базах. Автореферат оформлен в соответствии с общепринятыми стандартами и соответствует содержанию диссертационной работы.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Шеина М.Ю. изложена на 150 страницах и состоит из введения, обзора литературы по теме исследования, описания материалов и методов работы, главы с описанием полученных экспериментальных данных, обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего в себя 224 источника. В работе имеется 9 таблиц 31 рисунок.

Во введении диссертантом обоснована актуальность исследования, его новизна и практическая значимость. Целью данной работы была оценка роли генов, кодирующих белки AGO и DCL, компонентов РНКи, в формировании патогенной системы контрастных по устойчивости сортов мягкой пшеницы *T.aestivum* L. с возбудителем септориоза *S.nodorum*.

В обзоре научной литературы достаточно подробно изложены современные данные об РНК-интерференции, а также различных компонентах данного процесса. Приводится множество ссылок на актуальные статьи и результаты по данной теме. Также в этом разделе рассматриваются имеющиеся данные о влиянии различных индукторов, симбионтов и эндофитов на функционирование компонентов РНК-интерферирующей системы растений и грибов.

В главе, посвященной материалам и методам, достаточно подробно описана схема эксперимента, а также использованное оборудование и программное обеспечение для работы с полученным экспериментальным материалом и статистической обработки данных.

В главе «Результаты и их обсуждение» автором подробно представлены полученные результаты с использованием большого количества рисунков и диаграмм. Результаты описаны последовательно по разделам, к каждому рисунку автором дается подробное объяснение с ссылками на другие литературные источники, посвященные исследованию данной проблемы. Стоит подчеркнуть, что данная глава является самой большой в диссертационной работе.

В обсуждении автором, на основании полученных результатов и имеющихся данных литературы, рассматривается роль РНК-интерферирующей системы в общем каскаде защитных механизмов растений, механизмы ее (РНКи) активации под действием различных индукторов, а также взаимодействие компонентов данного механизма регуляции активности генов в патосистемах с двумя и более участниками.

В заключении подводятся итог на основе совокупности всех полученных данных проведенного исследования и резюмируются ключевые положения диссертационной работы.

Изложенные диссертантом выводы соответствуют поставленным целям и задачам.

Автореферат в краткой форме отражает суть данной диссертационной работы и включает в себя обоснование актуальности, выносимые на защиту положения, основные результаты исследования с прилагающимися к ним схемами и рисунками, заключение, выводы и список опубликованных диссертантом работ.

Общие вопросы и замечания по работе

В ходе анализа работы Шеина М.Ю., вместе с тем, были обнаружены определенные неточности и имеется ряд замечаний:

1) На стр. 7 говорится, что «получены трансгенные растения риса, показавшие снижение степени поражения грибом по технологии, установленной хозяином РНК-интерференции». Термин "Технология, установленная хозяином"- неудачный вариант перевода термина «Host Delivered RNA Interference» с английского языка.

2) На той же странице говорится, что «о работе системы РНК-интерференции в растениях, инфицированных фитопатогенами, и в особенности грибов-гемибиотрофов, к числу которых относится грибок *Stagonospora nodorum* Berk. - ничего не известно». При этом диссертантом в этом же разделе указывается много работ по данной теме на других патогенах.

3) 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-интерференцией)? Последнее важно, так как демонстрирует преемственность и логику исследования. Вместо этого, диссертант сразу переходит от общей теоретической задачи к своей цели. Но если просто изучать феномен РНКи, то лучше брать объект вроде арабидопсиса с небольшим геномом, а не столь сложный, как гексаплоидная пшеница, имеющая тройной набор гомеологичных генов. Кроме того, очевидно, что помимо теоретического аспекта вы преследовали и практическую цель, а именно: борьба с грибными заболеваниями (септориозом), приносящими ощутимый вред (какой?) для столь важной культуры как пшеница. В чем преимущество РНК-интерференции перед химическими пестицидами? В начале вы очень обобщенно коснулись этого, но хотелось бы более детально: представить в цифрах объем использования химических фунгицидов, их эффективность, в частности, для пшеницы, экологические последствия. Это

бы особенно подчеркнуло необходимость разработки альтернативных способов защиты.

4) В разделе «Научная новизна» говорится, что «Впервые установлено взаимное влияние на активность транскрипции растительных и грибных генов *AGO* и *DCL* системы РНК-интерференции в патогенной системе растений пшеницы и возбудителя септориоза *S. nodorum* Berk». Влияние чего? Я полагаю, что это неудачное построение фразы.

5) На стр. 9 отмечено, что «выявлена важная роль геномной составляющей хромосомы 7D в реализации экспрессии гена *TaAGO1* у растений пшеницы при инфицировании фитопатогенным грибом *S. nodorum*». Что автор имел в виду под "геномной составляющей"?

6) В Обзоре литературы не хватает главы, посвященной другим защитным механизмам растений, кроме РНКи. Салициловая и жасмоновая кислоты индуцируют множественные механизмы иммунитета растений, которые далеко не ограничиваются РНК-интерференцией и, хотя бы, краткое описание этих механизмов, на мой взгляд, было бы уместным в рамках данного обзора. В частности, не ясна связь РНКи с РАМР- иммунитетом, наверняка есть какие-то данные на этот счет.

7) В главе, посвященной взаимосвязи РНК-интерференции с салицилатным и жасмонатным путями очень не хватает визуальной схемы, поскольку довольно сложно понять и осмыслить в целом эту предполагаемую взаимосвязь, исходя из множества цитированных работ.

8) В разделе 2.5 «Подбор олигонуклеотидных последовательностей и построение филогенетических деревьев», в таблицах, где представлена структура праймеров неплохо бы было привести ссылки на соответствующие отдельным генам оригинальные работы.

9) В главе 2.6.3 Реакция от-ПЦР и полуколичественный анализ экспрессии гена отмечено, что: «Обратно-транскрипционную ПЦР (от-ПЦР) на основе мРНК исследуемых генов системы РНКи пшеницы и патогена осуществляли в 20 мкл общего объема смеси...». Здесь и далее диссертант

описывает реакцию обратной транскрипции, а не от-ПЦР. От-ПЦР проводят обычно в одной пробирке, но в вашем случае, насколько я понял, вы использовали синтезированную кДНК для различных независимых ПЦР. Кроме того, в этой главе нет упоминания о полуколичественной ПЦР-как она проводилась? То есть условия электрофореза и визуализации продуктов после ПЦР.

10) В конце главы 2.6.4 нужно было бы привести ссылки и обоснование-почему вы использовали именно эти гены в качестве референсных?

11) В названии главы 2.6.5 Электрофоретический анализ формирования ампликонов-следует убрать фразу «формирования». Там же указано, что: «При разделении фрагментов ДНК электрофорез проводили при напряжении 120 Вв...». Не существует такой единицы измерения и, вероятно, это – опечатка.

12) В разделе 2.7 «Статистическая обработка результатов» отмечено, что площадь зоны поражения на отрезках листьев измеряли с помощью компьютерной программы «ImageJ» (rsbweb.nih.gov/ij/download.html). Измерение площади поражения не является статистическим методом, и диссертант об этом уже писал ранее в гл. 2.4.3.

13) В работе имеется глава «Результаты и их обсуждение». Обычно пишут «Результаты». Если есть элементы обсуждения, было бы логично их перенести в соответствующий раздел.

14) 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. Это же замечание касается и материала для ПЦР в реальном времени - ни в гл. 2.6.4, ни в результатах не нашел этой информации. Также, в главе 3.1 и далее вы не обсуждаете, насколько этот

метод оценки устойчивости является новым: в принципе и в плане подбора конкретных референсных генов?

15) На стр. 63 указано: «Вместе с тем, у устойчивого сорта пшеницы Омская 35 наблюдалась менее выраженная активация транскрипции гена *TaDCL4* через 24 часа после инфицирования, в то время как активность транскрипции гена *TaAGO1* сохранялась на уровне контрольных образцов.» На самом деле, судя по рисунку, транскрипции *TaAGO1* даже несколько снижалась на 6ч после инфицирования относительно контроля.

16) В главе 3.8 непонятен алгоритм, использованный для построения филогении? В Методах про это тоже не сказано.

17) На стр. 109 указано, что «Наиболее важными компонентами этого относительно сложного механизма иммунитета являются рибонуклеазы AGO и DCL...». Вообще-то к рибонуклеазам точно относятся только DCL, AGO, хотя и содержит рибонуклеазный домен, к ним, насколько мне известно, не относятся и их биохимическая функция до конца пока не ясна.

18) В целом, обсуждение выглядит как констатация того, что в исследуемой области много нерешенных вопросов, при этом собственные результаты практически не обсуждаются, поскольку автор уже сделал это в предыдущем разделе. Оставляю это на усмотрение автора, лично я бы предпочел общепринятый формат, то есть результаты и отдельно обсуждение.

19) В целом, в тексте есть ошибки правописания. Есть повторы отдельных предложений в различных местах.

Заключение

Тем не менее, указанные замечания не снижают научное значение данной работы и квалификационный уровень ее автора. На основании вышеизложенного можно заключить, что по степени актуальности темы, уровню полученных научных результатов, степени их новизны, теоретической и практической значимости), а так же форме и содержанию диссертационная работа М.Ю. Шеина представляет собой научно-квалификационную работу, полностью соответствующую пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения

ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года, а ее автор - Шеин Михаил Юрьевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7- генетика.

Дата (20.02. 2024).

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, заведующий лабораторией инновационных средств защиты растений, ведущий научный сотрудник Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Андрей Борисович Щербань

Ученый секретарь Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»,
к.б.н.

Орлова Г.В.



Щербань

Данные оппонента:

Место работы: 630090, г. Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 10, Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН);

Должность: Доктор биологических наук, заведующий лабораторией инновационных средств защиты растений, ведущий научный сотрудник;

Телефон организации: +7(383) 363-49-80

Сайт организации: <https://www.icgbio.ru/>

E-mail: atos@bionet.nsc

Согласен на сбор, обработку, хранению и передачу моих персональных данных при работе диссертационного совета 24.1.218.01 по диссертационной работе Шеина 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).



Андрей Борисович Щербань

Дата (20.02.2024).

Подпись Андрея Борисовича Щербаня заверяю:

Ученый секретарь Федерального исследовательского центра
«Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения
Российской академии наук, к.б.н.



Орлова Г.В