

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Спеченковой Надежды Андреевны** «Идентификация белков, придающих устойчивость растениям картофеля к комбинированным (биотическим и абиотическим) стрессам, методом протеомного анализа», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 – «Биотехнология»

Актуальность исследования

Картофель — одна из важнейших продовольственных, кормовых, технических сельскохозяйственных культур, он является первой незерновой продовольственной культурой в мире. Повышение его урожайности и качества продукции – важнейшая задача для сельского хозяйства, особенно в свете глобальной продовольственной проблемы. Главными факторами, влияющими на урожайность, безусловно, являются биотические и абиотические стрессы. Основным фактор биотического стресса - вирусы, вызывающие больше половины новых вспышек болезней растений и наносящие огромный урон производству сельскохозяйственных культур в мировом масштабе. С другой стороны, наблюдающееся глобальное изменение климата - главный фактор абиотического стресса.

Данная работа посвящена изучению молекулярных механизмов, определяющих ответ растения картофеля на комбинированный стресс, вызванный вирусной инфекцией и тепловым воздействием. На основании сказанного выше считаю, что тема диссертационной работы Спеченковой Н.А. является, несомненно, актуальной.

Структура и общие сведения о диссертации

Работа Спеченковой Н.А. изложена на 141 странице машинописного текста, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и перечня литературы, включающего 137 источников и двух приложений. Диссертация иллюстрирована 29 рисунками и 5 таблицами.

Диссертацию предваряет глава «**Введение**», в которой автор коротко подчеркивает актуальность и необходимость проведения настоящего исследования, ставит цели и задачи предстоящей работы, дает определения объекту и предметам исследования, указывает основные положения, выдвигаемые на защиту, подчеркивает актуальность и научно-практическую значимость работы. Кроме того, во введении приводятся данные о научных докладах автора на специализированных конференциях.

Характеристика работы

В обзоре литературы описываются механизмы устойчивости растений к вирусным инфекциям. В частности, описана специфическая устойчивость растений к вирусам. Целый раздел посвящен Y вирусу картофеля как одному из экономически важных патогенов: анализируются имеющиеся данные о развитии устойчивости к нему и о зависимости развития инфекции от температуры.

Представляет интерес раздел обзора, посвященный протеомному профилированию как способу изучения механизмов устойчивости растений. В разделе цитируются работы по количественному протеомному анализу растений с использованием изотопной маркировки.

Самое непосредственное отношение к теме настоящей работы имеет часть, посвященная изменениям метионинового цикла при взаимодействии вирусов с растениями. В разделе дается краткое описание метионинового цикла, связи его с РНК-интерференцией и роли в развитии противовирусной устойчивости.

Прочтение обзора литературы, опирающегося на самые свежие экспериментальные и теоретические работы, критическое отношение автора к результатам ученых, работающих в этой области, указывает на его высокую научную эрудицию и хорошее знание литературы по теме диссертации. Кроме того, литературный обзор написан хорошим языком, четко структурирован и отлично иллюстрирован.

Успешное решение поставленных Спеченковой Н.А. задач во многом обусловлено **применением широкого спектра современных методов** биохимии, молекулярной биологии. Это позволяет высоко оценить научно-

методический уровень выполненной работы и достоверность полученных автором результатов, свидетельствует о прекрасной методической подготовке автора.

В главе **«Результаты и обсуждение»** представлены основные полученные автором результаты. В работе использовались два сорта картофеля – устойчивой к инфекции Y вируса картофеля (Гала) и восприимчивый (Чикаго). На первом этапе было показано, что у разных сортов устойчивость к вирусу может проявляться по-разному, а повышенная температура может увеличивать восприимчивость к инфекции.

Далее, для изучения реакции протеома контрастных сортов картофеля на заражение Y вирусом при повышенной и нормальной температуре был проведён количественный протеомный анализ с использованием iTRAQ технологии. Проведение относительного и абсолютного количественного протеомного анализа придает работе особую значимость. Тщательно продуманные и профессионально реализованные схемы протеомного профилирования позволили получить интересные результаты. В среднем, было идентифицировано 5000 – 6000 на эксперимент. Оказалось, что протеомный ответ восприимчивого сорта Чикаго менее выражен: при инфекции и нормальной температуре идентифицированы 16 и 23 группы дифференциально продуцирующихся белков, а в условиях комбинированного стресса – 64 и 152 группы на 8 и 14 дни после заражения, соответственно.

На основании этих данных автором было показано, что у восприимчивого сорта Чикаго снижается продукция всех ключевых ферментов метионинового цикла и связанного с ним фолатного подцикла в ответ на вирусную инфекцию при повышении температуры. Напротив, у устойчивого сорта Гала продукция этих ферментов повышалась.

Спеченковой Н.А. с использованием количественной обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции измерено изменение экспрессии генов, кодирующих ферменты метионинового цикла. Вполне ожидаемо, в некоторых случаях корреляции не наблюдалось. Тем не менее, этот этап необходим для дальнейшего понимания механизмов реакции растений на тепловой стресс и вирусную инфекцию.

Несомненным достоинством проведенного исследования является измерение концентрации основных метаболитов метионинового цикла при вирусной инфекции на фоне нормальной и повышенной температуры. Показано снижение концентрации S-аденозилметионина (SAM) – донора метильной группы и увеличение накопления S-аденозилгомоцистеина (SAH), ингибитора SAM-зависимых метилтрансфераз, что приводит к снижению соотношения SAM:SAH, известного как индекс метилирования.

Особую ценность работе придает тот факт, что автор не остановился лишь на измерении концентрации белков и метаболитов в объекте исследования. Для подтверждения своей гипотезы были проведены контрольные эксперименты, заключающиеся в обработке растений экзогенным метионином. Оказалось, что обработка инфицированных растений сорта Чикаго экзогенным метионином в условиях теплового стресса ингибирует накопление вирусной РНК в системных листьях растений и сопровождается увеличением индекса метилирования.

На заключительном этапе работы все полученные автором данные позволили построить схему предполагаемых механизмов, лежащих в основе восприимчивости или устойчивости растений картофеля к вирусной инфекции на фоне повышенной температуры.

Научная новизна и практическая значимость

Научная новизна состоит в том, что впервые проведен количественный сравнительный протеомный анализ устойчивых и восприимчивых к стрессам сортов картофеля, в том числе при комбинации вирусной инфекции и теплового стресса. Также впервые выявлена важная роль ферментов метионинового цикла и свободного метионина в устойчивости растений картофеля к инфекции Y вируса картофеля. Полученные данные о роли белков метионинового цикла в формировании устойчивости растений картофеля к Y вирусу картофеля расширяют фундаментальные знания о механизмах взаимодействия между вирусами и растениями.

С практической точки зрения, идентифицированные гены ферментов метионинового цикла могут рассматриваться как перспективные мишени при

создании устойчивых к стрессам сортов важных сельскохозяйственных культур, в том числе и методами геномного редактирования.

Автореферат диссертации полностью соответствует требованиям ВАК. Материалы автореферата соответствуют основным положениям диссертации.

Степень обоснованности научных результатов, выводов и рекомендаций

Основные положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации, данные в работе, хорошо обоснованы и подтверждены публикациями в рецензируемых международных журналах.

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

Достоверность научных результатов не вызывает сомнений. Экспериментальная часть работы выполнена с использованием современной научной базы. Выводы диссертации согласуются с известными теоретическими и практическими знаниями.

Полнота изложения основных результатов диссертации в научной печати

По материалам диссертации опубликовано 6 работ, в том числе 3 статьи в научных рецензируемых изданиях с высокими импакт-факторами.

Основные положения диссертационной работы представлены в виде устных и стендовых докладов на конференциях. Высокая публикационная активность, несомненно, подчёркивает актуальность выполненных исследований и перспективу внедрения в практику полученных в работе результатов.

Оценка содержания диссертации в целом, замечания и вопросы по диссертации.

Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Полученные Спеченковой Н.А. результаты не вызывают сомнений, выводы работы надежно подкреплены экспериментальными данными и являются обоснованными.

К работе есть несколько замечаний.

В оглавлении отсутствует п. 1.1.4. Зависимость вирусной инфекции от температуры, который имеется в обзоре литературы.

Стр. 20. Поскольку в разделе 1.2 обзора литературы речь идет только о изучении механизмов устойчивости растений к вирусам, то его следовало бы назвать «Протеомное профилирование как способ изучения механизмов устойчивости растений к вирусным инфекциям».

Стр.29. Возможно, следовало бы завершить обзор литературы суммированием изложенного материала и продемонстрировать его связь с целью диссертационной работы.

Стр. 31. Таблицу 1 можно было бы заменить одним предложением.

Стр. 37. Осталась непонятна формулировка «Поскольку количественный протеомный анализ с использованием меток iTRAQ снижает величину реального изменения представленности белков между двумя образцами...».

На протяжении всего текста диссертационной работы используется выражение «дифференциально экспрессирующиеся белки». Замечу, что экспрессироваться могут лишь гены. Белки синтезируются, продуцируются. Кроме того, выражения «снижающиеся и растущие белки», также используемые автором, на мой взгляд, не совсем корректны и являются, скорее, лабораторным сленгом.

Однако высказанные замечания не меняют общего превосходного впечатления о выполненной работе и ее высокой научной ценности.

Заключение

На основании сказанного выше можно сделать вывод, что диссертация Спеченковой Надежды Андреевны «Идентификация белков, придающих устойчивость растениям картофеля к комбинированным (биотическим и абиотическим) стрессам, методом протеомного анализа» представляет собой законченное квалификационное научное исследование, выполненное на актуальную научную тему, в ходе которого получены новые данные, имеющие существенное научное и практическое значение для биотехнологии, и соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. №

426), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент,

заместитель генерального директора по научной работе

заведующий лабораторией генной инженерии

Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

Лазарев Василий Николаевич

07.02.2022 г.

Контактные данные:

Тел: +7 (499) 245-04-71

Электронный адрес: lazarev@rcrcm.org

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)

Адрес: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а

Подпись д.б.н., доцента Лазарева В.Н. заверяю

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

к.б.н.



Т.Н.Грибова