Отзыв официального оппонента
о диссертации Архипова Андрея Владимировича «ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ X ВИРУСА ШАЛОТА (РОД ALLEXIVIRUS) С ФАКТОРАМИ АНТИВИРУСНОГО ИММУНИТЕТА РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА»
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Актуальность темы

Актуальность задачи исследования взаимодействия растения и вирусного патогена представляется очевидной. В качестве модели при решении этой задачи соискатель использовал персистентную инфекцию X вируса шалота (ХВШ), типового представителя нового рода аллексивирусов, в растениях вида Allium cepa var. aggregatum G. Don являющимся новым и до настоящего исследования, считавшегося единственным восприимчивым хозяином ХВШ. Кроме России, ХВШ обнаружен в Германии, Голландии, Индии, Новой Зеландии, Судане и в настоящем исследовании в Эквадоре. Представляется актуальным изучение изменений в вирусном геноме в процессе длительной адаптации к условиям размножения в новом хозяине.

Целью исследования являлось изучение влияния инфекции X вируса шалота на механизмы иммунной системой растения хозяина. Работа выполнена в лаборатории молекулярной вирусологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), г. Москва.

В ходе выполнения исследования были решены следующие задачи:

- Проведен анализ и выявлены адаптационные изменения, произошедшие в вирусном геноме в процессе длительной репродукции в вегетативно размножаемых растениях шалота.
- Идентифицированы обладающие супрессорной активностью белки X вируса шалота, позволяющие эффективно ингибировать локальный и системный сайленсинг генов - один из механизмов антивирусного иммунитета.
- Проверена гипотеза, согласно которой ХВШ оказывается способным репродуцироваться в растениях шалота благодаря его способности индуцировать PTI и транскрипционное репрограммирование, в результате чего вирус подавляет различные факторы антивирусного иммунитета.
- Идентифицированы в геноме Allium cepa var. aggregatum G. Don., нуклеотидные последовательности, кодирующие ключевые факторы антивирусного иммунитета.
- Проведена оценка экспрессии генов, участвующих в антивирусном фитоиммунитете, в безвирусном и инфицированном ХВШ шалоте.
- Проверена гипотеза о Allium cepa var. aggregatum G. Don., как единственом растении-хозяине X вируса шалота.

Научная новизна работы

В данной работе установлен факт репродукции X вируса шалота в отсутствии собственного белка супрессора РНК – сайленсинга. Подтверждена гипотеза, объясняющая факт репродукции ХВШ, способностью вируса полностью или частично подавлять экспрессию белков антивирусного фитоиммунитета благодаря его способности индуцировать PTI и транскрипционное репрограммирование. Установлен факт репродукции ХВШ в посадках чеснока Allium sativum.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

– Функциональные модули РНК-генома ХВШ, демонстрируют различную скорость эволюционных изменений, имеющих явный адаптационных характер, приобретенный в результате репродукции в новом хозяине.

– Репродукция X вируса шалота проходит, в отсутствии собственного белка супрессора. Установлено отсутствие супрессорной активности РНК-сайленсинга у белков, кодируемых геномом X вируса шалота.

– Впервые идентифицированы последовательности кодирующие фрагменты генов обуславливающие антивирусный фитоиммунитет (факторы РНК-сайленсинга, PTI, аутофагии и RNA Quality Control) Allium cepa var. aggregatum G. Don. Представлен анализ уровней экспрессии данных последовательностей.

– Подтверждена гипотеза, объясняющая факт репродукции X вируса шалота, в отсутствии собственного белка супрессора, способностью вируса в результате индукции PTI и контролируемого во времени избирательного изменения уровней экспрессии ряда генов-мишеней полностью или частично подавлять экспрессию белков антивирусного фитоиммунитета.

– Показана возможность репродукции ХВШ в Allium sativum L.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа оформлена в стандартном виде, изложена на 186 страницах машинописного текста и состоит из Введения, большого Обзора литературы (84 стр.), главы с описанием использованных материалов и методов, главы с описанием полученных результатов, Заключения и Списка цитируемой литературы, включающего ссылки на 230 отечественных и зарубежных источников. Полученные результаты проиллюстрированы 16 таблицами и 23 рисунками.

Оценка оформления работы.

В целом, диссертационная работа Архипова А.В. написана в хорошем научном стиле, оформлена в соответствии с ГОСТ. Обзор литературы подчинен общей логике исследовательской работы, описание методов работы содержит все необходимые ссылки. Проведенные экспериментальные исследования базируются на основе анализа литературных данных. Экспериментальные данные логичны, последовательны, имеют корректную методическую проработку. Анализ результатов экспериментов, а также иллюстративный материал позволяют признать достоверность и правильность интерпретации полученных результатов и представленных в тесте диссертации и автореферате выводов. Выводы работы соответствуют поставленной цели, определенным задачам, и результатам проведенных Архиповым А.В. теоретических и практических исследований.

Несмотря на общий высокий уровень представленной диссертации, у рецензента есть вопросы и замечания:

1) Стр. 10: В 1993, в лаборатории молекулярной вирусологии ВНИИСБ, открыт гибкий, палочковидный, передающейся клещом вирус, обладающий характерным, присущим только ему, строением генома. Вирус назван X вирусом шалота. (Vishnichenko, et.al., 1993, Kanyuka, et.al., 1992). – Если первая публикация вышла в 1992, то открытие надо датировать тем же годом.

2) Стр. 11 Целью настоящего исследования являлось изучение влияния инфекции X вируса шалота на механизмы иммунной системой растения хозяина Провести анализ и выявить возможные адаптационные изменения, произошедшие в вирусном геноме в процессе длительной репродукции в вегетативно размножаемых растениях шалота. – Возникает вопрос о возможном разнообразии вируса в исходной популяции растений. Есть ли опубликованные данные, позволяющие утверждать, что растения обычно заражены не смесью штаммов?

3) Стр. 27 Алексивирусы обнаружены во Франции, Испании (Van Dijk, 1993), Израиле, Словении (Mavric и Ravnikar, 2005), Германии, Голландии, Индии и Новой Зеландии, и других странах (Hamed et. al., 2012). – Наиболее свежая ссылка датирована 2012 годом. Возникает вопрос - есть ли более свежие данные о распространенности

Алексивирусов в мире, например по результатам анализа депонированных в ГенБанк NCBI последовательностей нуклеиновых кислот данного таксона?

4) Стр. 28 **2. X вирус шалота (ХВШ) - прототип рода Allexivirus. 2.1. Открытие X вируса шалота.** Замечание: Данный раздел дублирует информацию приведенную ранее на стр. 21. «На основании анализа вышеизложенной информации и принимая во внимание способ передачи, форму вириона, серологические свойства, характерные особенности строение генома сотрудниками лаборатории молекулярной биотехнологии ВНИИСБ (Zavriev, Vishnichenko, 2000), предложили выделить новый род растительных вирусов - *Allexivirus* (*Allium X virus*), прототипом которого является X вирус шалота».

5) Материалы и методы Стр. 98 В ряде экспериментов, аналогичным образом высевали и выращивали растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*). – Должны быть указаны названия образцов и источники семян всех используемых образцов *Arabidopsis thaliana*

6) раздел **10. ПЦР в реальном времени** Стр. 98 Уровень накопления ХВШ в растениях оценивали по результатам электрофоретического анализа ампликонов, полученных методом обратной транскрипции РНК ХВШ и полимеразной цепной реакции к-ДНК ХВШ с использованием диагностических праймеров IAV-F 5'-CYG-CTA-AGC-TAT-ATG-CTG-AAR-GG-3' и IAV-R 5'-TGT-TRC-AAR-GTA-AGT-TTA-GYA-ATA-TCA-ACA-3' (Majumder et. al., 2007). Замечание – в данном разделе не указано, какие гены растения/праймеры были использованы в качестве контроля. На стр. 103 указано, что «… в качестве калибратора использовали сеянцы шалота, в качестве нормалайзера (norm) – ген растительной 18S рибосомальной РНК, уровни экспрессии которого в здоровых и инфицированных образцах шалота были одинаковы.». Не очевидно, что этот контроль был использован и для оценки уровня накопления ХВШ (стр. 98).

Замечание 1: Судя по описанию метода с использованием сайбер грин, амплификацию с праймерами на ген растительной 18S рибосомальной РНК и целевых генов проводили в разных пробирках. Это методически не корректно, так как увеличивает ошибку опыта.

Замечание 2: Праймеры для амплификации растительной 18S рибосомальной РНК указаны только на стр. 132 в разделе Результаты: «Таблица 10. Праймеры амплифицирующие участки гомологичные последовательностям растительных RDR и 18s РНК.», их надо было привести в разделе Материалы и методы.

7) Раздел Результаты Стр. 112 Рисунок 12. Схема сходства выравненных нуклеотидных последовательностей ShVX JX310755 и установленной ранее (Kanyuka et. al.,1992), Шкала Y приводит значения сходства от 0 до 4. Причем 4 – соответствует консервативным регионам генома вируса. Что это за единицы?

8) Стр. 113 Таблица 6. Сходство нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей кодируемых ими белков, вычисленное на основании сравнения родительского и дочернего изолятов русского штамма ХВШ

Замечание: Сходство аминокислотных последовательностей ОРС1 (репликаза), ОРС4 (КБ) и ОРС5 (ЦББ) ниже, чем нуклеотидных последовательностей. Указано, что «При этом только пять из 25 аминокислотных замен (20%) локализуются в последовательностях консервативных мотивов, тогда как на кодирующие их районы гена приходится 30% нуклеотидных замен.» Вероятно, это вызвано преимущественным изменением нуклеотидов в 3-й позиции кодонов. Это надо обсудить подробнее.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней

Изучение диссертации, автореферата и опубликованных автором работ позволяет сделать вывод о том, что исследование проведено соискателем самостоятельно, диссертация написана лично автором, на высоком научном и профессиональном уровне, с

использованием современных методов научных исследований, обладает внутренним единством и содержит новые научные результаты, имеющим теоретическое и практическое значение. Основные научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.6 – Биотехнология, а именно областям исследований: 2. Генетические, селекционные и иммунологические исследования в прикладной микробиологии, вирусологии и цитологии. Технологии культивирования микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных.

Диссертация Архипова Андрея Владимировича «ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ X ВИРУСА ШАЛОТА (РОД ALLEXIVIRUS) С ФАКТОРАМИ АНТИВИРУСНОГО ИММУНИТЕТА РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология, является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки России к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по п. 9 – 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» от 24 сентября 2013 года № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Архипов Андрей Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Официальный оппонент

Игнатов Александр Николаевич
доктор биологических наук, профессор
агробиотехнологического департамента,
аграрно-технологического института (АТИ) РУДН

Место работы: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы» (РУДН им. Патриса Лумумбы) (адрес: 17198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8 к.2. тел: +7 926 197-36-00 e-mail: ignatov_an@pfur.ru)

24 сентября 2024 г.

Подпись Игнатова А.Н. удостоверяю

Друковский Станислав Геннадиевич, к. в.н.
Секретарь Учёного совета АТИ РУДН
Телефон: (495) 787-38-03
E-mail: drukovskiy-sg@rudn.ru