

УТВЕРЖДАЮ:

Директор

Федерального государственного
бюджетного научного учреждения

«Федеральный научный
центр овощеводства»

д.с.-х.н., академик РАН

А.В. Солдатенко

19.09.2024 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО) на диссертационную работу Архипова Андрея Владимировича «Взаимодействие X вируса шалота (род *Allexivirus*) с факторами антивирусного иммунитета растения-хозяина», представленную к защите в диссертационный совет 24.1.016.01 (Д 006.027.01), на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Актуальность темы. В растительной клетке функционируют, по меньшей мере, два антивирусных иммунных механизма, "запускаемых" при участии двуцепочечных вирусных РНК – РНК-сайленсинг и РТИ (pattern triggered immunity – паттерн-активированный иммунитет). Но в литературе встречается мало информации, посвященной исследованию взаимодействия данных молекулярных процессов между собой, а также изучению изменений, которые могли произойти в вирусном геноме в процессе длительной адаптации к условиям размножения в новом хозяине, позволяющих вирусу успешно противостоять врожденному иммунитету растений. Тогда как понимание молекулярных механизмов, обуславливающих устойчивость растений к вирусной инфекции, позволит выяснить, как эти процессы могут быть перепрограммированы с целью конструирования форм сельскохозяйственных растений, находящихся во взаимовыгодных симбиотических отношениях с инфицирующими их вирусами. В связи с этим, диссертационное исследование Архипова А.В., посвященное изучению влияния X - вируса шалота на механизмы иммунной системы растения-хозяина, является весьма актуальным.

Научная новизна. Впервые автором установлена способность X - вируса шалота к репродукции в отсутствие собственного белка супрессора РНК – сайленсинга в результате полного или частичного изменения экспрессии белков, задействованных в обеспечении антивирусного фитоиммунитета. Доказано, что подавление экспрессии ключевых факторов

РНК-сайленсинга в инфицированных растениях и избирательное изменение уровней экспрессии ряда генов мишеней, обусловлено индукцией вирусом процесса РТІ. В настоящей работе впервые автором установлена способность репродукции Х-вируса шалота в растениях чеснока (*Allium sativum*).

Теоретическая и практическая значимость работы. В данной работе подтверждена гипотеза, объясняющая факт репродукции Х-вируса шалота, в отсутствии собственного белка супрессора, способностью вируса полностью или частично изменять экспрессию белков, задействованных в обеспечении антивирусного фитоиммунитета. Подавление экспрессии ключевых факторов РНК-сайленсинга в инфицированных растениях и, контролируемое во времени, избирательное изменение уровней экспрессии ряда генов-мишеней, кодирующих другие факторы антивирусного фитоиммунитета, обусловлено индукцией вирусом процесса РТІ. В настоящей работе установлен факт репродукции Х-вируса шалота в посадках чеснока (*Allium sativum*).

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций. Экспериментальные данные, полученные в ходе использования на экспериментальном материале современных общепринятых методов, корректно проанализированы и согласуются с теоретическими научными положениями в исследуемой области, что подтверждает достоверность результатов исследований, на основании которых сформулированы выводы.

Научная специальность, которой соответствует диссертация. Диссертационная работа соответствует научной специальности 1.5.6 – Биотехнология

Оценка содержания диссертации. Диссертационное исследование Архипова А.В. состоит из введения, трёх глав, заключения, изложено на 187 страницах, содержит 16 таблиц, 23 рисунка. Список цитируемой литературы включает 238 источников, из них 224 –иностраных.

Во введении соискателем обоснована актуальность исследования, определены цель и задачи, представлена научная новизна и практическая значимость, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

Глава 1 представляет собой обзор актуальных зарубежных и российских источников литературы и содержит проанализированную автором диссертации информацию о географическом распространении, таксономии, строении, серологических и биологических свойствах рода *Allexivirus* и представителя Х-вируса шалота, а также молекулярных механизмах антивирусного ответа.

Глава 2 содержит подробное описание материалов и методов исследования. Автором подробно и последовательно изложены методы сбора растительных образцов, пробоподготовки, выделения нуклеиновых кислот, получения вирусного препарата Х-вируса шалота, оценки уровня накопления Х вируса шалота, компьютерный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, анализ полноразмерных кДНК копий генов, кодирующих белки Х вируса шалота, инокулирование интактных растений.

В главе 3 на основании степени сходства нуклеотидных последовательностей родительского и дочернего изолятов ХВШ, приведены результаты изменений в их геномах. Причем наибольшее число отличий наблюдается в районах, включающих открытые рамки считывания генов белков ТБГ1, ТБГ2 и р42. На основании проведенных опытов по исследованию супрессорной активности белков кодируемых 3'- областью генома X вируса шалота, представлены результаты, свидетельствующие о том, что в отличие от своих потекс- и карлавирусного гомологов, TGBp1 белок ХВШ (ORF2) не ингибирует также и системный РНК – сайленсинг. Поэтому автор делает вывод, что ХВШ репродуцируется в растениях шалота в отсутствии собственного активного белка-супрессора РНК-сайленсинга. Данный факт может объясняться способностью вируса подавлять или изменять экспрессию генов антивирусного фитоиммунитета. Архиповым А.В. впервые представлены доказательства экспрессии в растениях шалота нуклеотидных последовательностей, кодирующих три домена различных дайсер-подобных белков, растительную РНК зависимую полимеразу и 18S РНК. Автором были обнаружены и идентифицированы транскрипты, кодирующие комплекс факторов участвующих в процессах РТИ, аутофагии, и RQC в растениях шалота, создана система специфических праймеров, позволяющих 162 определять уровни представленности указанных транскриптов-мишеней методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Замечания и предложения. Наряду с несомненными достоинствами рассматриваемой диссертационной работы, имеется ряд замечаний дискуссионного характера:

1. При упоминании в тексте в первый раз объекта исследований – X-вируса шалота - нужно было указать полное название на латинском и русском языках с использованием международной аббревиатуры, при повторном упоминании - международную аббревиатуру. У автора в тексте нет единообразия: где-то использует X-вируса шалота (ХВШ), где-то - *Shallot virus X* (ShVX), хотя другие вирусы – только на латыни.

2. Также нет единообразия при первом и последующем упоминании таксономии растений: где-то автор использует русские названия, где-то латынь, причем с сокращением при первом их упоминании. Например, не понятно, о какой культуре идет речь на стр. 23: впервые автор упоминает культуру *C. murale*, которая является «...хозяином для большинства алексивирусов, кроме ХВШ...». Имеется ввиду *Chenopodium murale* L.?

3. Стр. 21 – автор пишет «...предложили выделить новый род растительных вирусов - Alexivirus, прототипом которого является X вирус шалота». Что значит прототип? Может быть представитель этого рода?

4. Разделы «Новизна исследований», «Теоретическая и практическая значимость исследований» необходимо было бы представить отдельно. Несколько «размыто» представлена новизна исследований, в которой конкретно не указывается, что исследователь сделал впервые для

отечественной или мировой науки. И не понятно, в чем теоретическая и особенно практическая значимость работы?

5. Не ясно, в чем принципиальное различие разделов 1 и 2 в обзоре литературы. Их можно было бы объединить, так как в разделе 2 фактически повторяется информация из раздела 1.

6. Встречается ряд некорректных формулировок: Стр.24 – правильно было говорить «горизонтальная передачи» вируса, а не «перенос»; не «состояние толерантности к вирусу», а собственно «устойчивость».

7. Автор пишет, что «инфекция X вируса шалота протекает в латентной форме». А в чем же его вредоносность? Каковы потери урожая? В чем они проявляются? Это помогло бы при чтении диссертации понять, почему именно этот вирус выбрали в качестве объекта исследований.

8. Не указаны годы исследований. Годы упоминаются только при самоцитировании в результатах исследований.

9. В каждом из разделов, посвященных результатам и их обсуждению, автор повторно зачем-то приводит информацию из обзора литературы, а также материалы и методы. Данный раздел исключительно должен быть посвящен полученным результатам и их интерпретации. Кроме того, текст излагается в виде тезисных ссылок на свои работы.

10. Таблицу 5 нужно было бы разместить в разделе «Материалы и методы», так как это не оригинальное исследование, используемые праймеры с ссылкой на Kanyuka et. al., 1992.

11. В конце раздела 1 автор делает заключение, что причиной наблюдаемых изменений в геноме X-вируса шалота является адаптация к новому растению-хозяину. Вопрос: о каком НОВОМ растении-хозяине идет речь?

12. Стр. 154 – на основании каких данных автор делает вывод, что «индукция РТІ и обусловленное этим транскрипционное репрограммирование являются механизмами, общими для всех РНК-содержащих вирусов»?

13. В данной работе исследователем разработаны праймеры, амплифицирующие участки гомологичные последовательностям растительных RDR и 18s РНК, которые могут быть рекомендованы для дальнейших молекулярно-биологических исследований соответствующих последовательностей *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don. Этот факт очень хорошо можно было бы осветить в разделе «Практическая значимость», но автор скромно о нем умолчал.

14. Очень скупо представлены результаты исследований в разделе 5, посвященном репродукции X вируса шалота в чесноке, практически не представлены. Нет ни таблиц, ни графического материала, практически вся информация посвящена обзору литературы и методической части.

Заключение.

Диссертационная работа Архипова Андрея Владимировича «Взаимодействие X вируса шалота (род *Allexivirus*) с факторами антивирусного иммунитета растения-хозяина» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на примере X-вируса шалота содержится новая информация о влиянии вирусной инфекции на молекулярные механизмы иммунного ответа в системе растение-хозяин, что найдет широкое применение в области вирусологии и молекулярной биологии. Работа по содержанию, актуальности, новизне, практической и теоретической значимости полученных результатов соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, согласно требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор, Архипов Андрей Владимирович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Отзыв на диссертацию и автореферат Архипова Андрея Владимировича рассмотрен и одобрен на заседании лаборатории молекулярно-иммунологических исследований ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства» (протокол № 6 от «22» августа 2024 года).

Заведующий лабораторией
молекулярно-иммунологических
исследований,
кандидат сельскохозяйственных наук
(06.01.05 – Селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений,
06.01.06 – Овощеводство)

Ирина Александровна
Енгальчева

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр овощеводства»

Адрес: 143080, Московская область, Одинцовский городской округ, поселок
ВНИИССОК, ул. Селекционная, д. 14.

Телефон: +7 (495) 599-24-42

E-mail: priemnaya@vniissok.ru

Подпись зав. лабораторией молекулярно-иммунологических исследований,
к.с.-х.н. И.А. Енгальчевой удостоверяю:

Начальник отдела кадров



Высоцкая О.А.