

О Т З Ы В

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

Среди проблем сельскохозяйственной биотехнологии, в настоящее время одними из наиболее важных являются вопросы изучения воздействия на растения различных типов стрессов, включая биотические и абиотические факторы. Для разработки эффективных подходов к защите растений от множественных стрессов определяющим является понимание механизмов формирования устойчивости. Весьма распространенными методами для исследования молекулярных ответов устойчивого и восприимчивого сортов на комбинированный стресс стали методы протеомики. Применение протеомного анализа позволяет понять, какие стратегии, определяющие устойчивость сорта, реализуются в растениях и идентифицировать ключевые гены-мишени, перспективные для практического использования.

Данная работа посвящена изучению молекулярных механизмов, определяющих ответ растений картофеля на комбинированный стресс, вызванный биотическими (вирусная инфекция) и абиотическими (тепловое воздействие) факторами. Картофель имеет очевидные преимущества в качестве объекта для сравнительных протеомных исследований, а именно: высокая практическая значимость этой культуры в России, кроме того, наличие сортов, контрастных по устойчивости к патогенам и различным абиотическим факторам, достаточно хорошая аннотация нуклеотидной последовательности генома. Принимая во внимание ускорение процессов, способствующих глобальным изменениям климата, исследование молекулярных и генетических основ комбинированной устойчивости

растений картофеля к стрессам различной природы является актуальным и более чем своевременным.

В настоящее время весьма распространенными методами для исследования генетического полиморфизма у растений являются различные варианты протеомного анализа, не связанные непосредственно с установлением первичной структуры ДНК, но позволяющие получать тонкие индивидуальные характеристики генотипа. Так в ряде работ были применены успешные подходы с использованием протеомики для изучения механизмов устойчивости растений к вирусным инфекциям. Становится очевидным, что изменения, происходящие на уровне протеома, могут участвовать в формировании иммунного ответа растений. Например, было показано, что вирусная инфекция влияет на синтез некоторых патоген-ассоциированных белков и оказывает негативное воздействие на фотосинтез.

В последнее время новый метод профилирования протеома широко применяется для количественного анализа. Он заключается в применении изобарных меток для относительного и абсолютного количественного анализа (iTRAQ). Этот метод с успехом применялся в ряде работ по изучению изменения метаболизма растений в ответ как на абиотические стрессы, в частности, низкая и высокая температуры, засоление, так и на биотические стрессы, включая поражения растений грибами, бактериями и вирусами.

Диссертационная работа Спеченковой построена по традиционной для кандидатских диссертаций схеме и состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы исследования, раздела результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. В работе использованы 137 литературных источников. Иллюстрации включают 5 таблиц и 29 рисунков.

Во введении достаточно четко и полно сформулированы цели и задачи исследования, научная новизна, актуальность исследования, а также область применения и практическая значимость исследования.

В обзоре литературы автор описывает общие механизмы устойчивости растений к вирусной инфекции. После чего рассматривается общая характеристика одного из главных патогенов картофеля – Y-вируса картофеля, включая зависимость вирусной инфекции от температуры. Кроме того, достаточно детально разные аспекты проблемы устойчивости картофеля к вирусу.

Отдельный раздел обзора посвящен методу протеомного профилирования как способу изучения механизмов устойчивости растений к стрессам. Детально рассмотрены особенности дифференциальной экспрессии белков во время вирусной инфекции. Отдельно описываются общие принципы iTRAQ анализа. Последний раздел обзора включает рассмотрение роли метиониновый цикла и ассоциированных с ним путей в каскаде защитных реакций противовирусного ответа растений. Обзор написан хорошим языком и содержит всю необходимую информацию по литературным ссылкам для ознакомления с историей проблемы и понимания общей значимости работы.

В разделе «Материалы и методы» представлен спектр современных методов, использованных автором в работе. Эти методы традиционны в данном направлении исследований и в диссертации весьма грамотно применены. Эти методы включают вирусологические и биохимические методы, включая выделение тотального белка из растений, трипсинолиз белка, измерение уровня накопления растительных метаболитов и выделение тотальной РНК из растений. Детально описан метод протеомного анализа с использованием меток iTRAQ. Из этого раздела становится очевидным, что автор на хорошем экспериментальном уровне владеет методами молекулярной биологии и вирусологии.

Экспериментальная часть диссертации (раздел Результаты и Обсуждение) включает несколько частей, соответствующих заявленной структуре работы. В начале этой части автором были изучены динамики накопления вирусной РНК у контрастных сортов картофеля с повышенной и пониженной

восприимчивостью к вирусным заболеваниям и тепловому стрессу. Динамика накопления вирусной РНК была определена с помощью метода ПЦР в реальном времени. Оказалось, что у контрастных сортов устойчивость к вирусу может проявляться по-разному, а повышенная температура может оказывать позитивное влияние на увеличение восприимчивости к инфекции PVY у картофеля.

В следующем разделе с использованием протеомных методов были проанализированы ответы контрастных сортов на вирусную инфекцию и комплексно на вирусную инфекцию плюс повышенную температуру. Для восприимчивого сорта Чикаго всего было идентифицировано 19376 пептидов, которые относились к 5057 белкам. Для устойчивого сорта Гала всего было идентифицировано 5939 белков. Оказалось, что при повышенной температуре изменения протеома восприимчивого сорта Чикаго в ответ на вирусную инфекцию были более выраженными. При анализе белков, экспрессия которых снижается при стрессе, были обнаружены группы белков, связанные с такими биологическими процессами, как трансляция, метаболический клеточный амидный процесс и биосинтетический амидный процесс. На 14ый день в условиях комбинированного стресса было также идентифицировано 79 белков с растущей экспрессией, из которых можно отметить известные защитные белки, такие как β -глюканаза, индуцируемый поранением противогрибковый белок, кислая эндохитиназа и хитиназа класса II.

В отличие от сорта Чикаго, ответ сорта Гала на вирусную инфекцию при нормальной температуре был намного интенсивнее. В частности оказалось, что из 11 растущих в ответ на вирусную инфекцию белков большинство относится к хлоропластным белкам, включая белок фотосистемы I P700 апопротеин A1, белки фотосистем II D1 и D2, хлорофилл a-b связывающий белок 6A, белок фотосистемы II 22 kDa. Более того, диссертант отметил повышение представленности S-аденозилметионин зависимой метилтрансферазы, одного из ферментов метионинового цикла, который, как

известно, тесно связан с противовирусным ответом растений. В то же время, анализ снижающихся белков показал, что большинство связанных с ними процессов было вовлечено в защиту от окислительного стресса, удаление супероксидных радикалов, клеточный ответ на активные формы кислорода, а также с трансляцию.

В ходе дальнейших исследований диссертант обнаружил, что в условиях комплексного стресса протеомный ответ оказался намного более выраженным. В частности, среди растущих белков было несколько представителей семейства белков теплового шока. Был также отмечен рост некоторых хлоропластных белков, например, белков фотосистемы II и группы белков “рубиско”. Также была повышена экспрессия белка теплового шока, содержащего концевой домен DNAJ и цистатионин β -лиазы, который является вторым ферментом, катализирующим синтез гомоцистеина – предшественника метионина. Среди белков с пониженной регуляцией были выявлены такие белки, как белок SGRP-1, СОД, фактор инициации трансляции eIF1 и гермин.

В следующем разделе результатов (раздел 3) автором отдельно рассмотрена роль ферментов метионинового цикла в формировании ответа растений на инфекцию, вызываемую Y-вирусом картофеля. В результате протеомного анализа заражённых PVY растений сорта Чикаго, диссертантом было обнаружено изменение экспрессии для несколько белков, участвующих в метиониновом цикле и сопутствующих путях. Более того, оказалось, что в отличие от согласованного снижения представленности ферментов метионинового цикла у восприимчивого сорта Чикаго, представленность этих ферментов у сорта Гала была выражена по-разному при разных температурах и на разных стадиях инфекции, но преимущественно росла. Был выяснен интересный факт, что повышенная температура не оказала значительного влияния на экспрессию генов ферментов метионинового цикла контрольных, неинокулированных растений по сравнению с нормальной температурой. По мнению диссертанта, это свидетельствует о

том, что изменения на уровне транскрипции этих генов являются следствием интегрированного ответа растений картофеля как на инфекцию PVY, так и на повышение температуры.

Далее диссертантом было исследовано влияние стрессов на накопление ключевых метаболитов метионинового цикла для дальнейшего выяснения возможных связей между активностью метилирования и устойчивостью к вирусу. По мнению диссертанта, изменения в концентрациях метаболитов или их соотношениях могут затрагивать широкий спектр реакций трансметиления и оказывать влияние на исход вирусной инфекции. В ходе этой части работы было выявлено, что обработка метионином повышает устойчивость растений картофеля восприимчивого сорта Чикаго к инфекции PVY при повышенной температуре.

В последней части Результаты и обсуждения диссертант изложил свои представления о предполагаемых механизмах, лежащих в основе устойчивости растений картофеля к вирусной инфекции на фоне повышенной температуры.

К незначительным замечаниям по тексту диссертации можно отнести довольно редкие опечатки и синтаксические погрешности, а также неоправданное использование англицизмов, например, *mock-инокулированные* вместо *буфер-инокулированные* (см. например, подпись к рис. 14). Приведенные мелкие замечания, естественно, не снижают значимости всей работы. Выводы, сделанные диссертантом достаточно обоснованы, а автореферат в целом отражает содержание работы. Важно отметить, что данная работа имеет весьма высокую практическую ценность для сельскохозяйственной биотехнологии.

Принимая во внимание изложенное выше, считаю, что диссертационная работа Спеченковой Надежды Андреевны полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертационным работам “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 ее автор заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией генной инженерии вирусов,
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (НИИФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ)

Д.б.н., профессор

Морозов Сергей Юрьевич

11 II 2022 г.



Контактные данные:

119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40

E-mail: morozov@genebee.msu.ru

Тел. +74959393198

Директор НИИФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ

Академик В.П. Скулачев

