

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ ВНИИСБ

Г.И. Карлов
«29» ноября 2022 г.



Отзыв

ведущей организации на диссертационную работу
Супруна Андрея Романовича на тему:
**«РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ARABIDOPSIS THALIANA L. С
ПОМОЩЬЮ ЭКЗОГЕННОГО ПРИМЕНЕНИЯ IN VITRO
СИНТЕЗИРОВАННЫХ РНК»**, представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6 – Биотехнология
(биологические науки) и 1.5.4 – Биохимия (биологические науки)

Актуальность темы выполненной работы

Разработка методов для быстрого управления экспрессией целевых генов является актуальной темой современной биологии. Среди палитры доступных современных методов для сайленсинга генов, применение экзогенных двуцепочечных РНК (дцРНК) относится к относительно слабо оптимизированным. Но данный метод достаточно привлекателен своей простотой, особенно учитывая имеющиеся способы прямого синтеза РНК. Однако, эффективность экзогенного применения дцРНК зависит от множества факторов. Изучение влияния этих факторов и оптимизация условий для повышения эффективности дцРНК для сайленсинга генов безусловно относится к актуальным направлениям.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов, сформулированных в диссертации

Научная новизна диссертационной работы заключается в том, что впервые детально изучены различные факторы, влияющие на эффективность регуляции генов и транскриптов после экзогенного применения дцРНК для растений.

Достоверность результатов исследования

Полученные Супруном А. Р. научные результаты и выводы являются обоснованными и достоверными. Это обусловлено адекватностью выбранных методических подходов, правильностью использования этих методов, правильным отбором выборки, систематизацией полученных данных, его статистической обработкой. Все выводы сделаны на основе результатов статистической обработки результатов исследования. Работа выполнена на современном методическом уровне.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Научно-практическая значимость работы не вызывает сомнений, так как затрагивает вопросы создания технологии регуляции экспрессии генов растений без использования трансгеноза. В рамках работы детально изучены и оптимизированы факторы, лимитирующие эффективность использования экзогенных дцРНК. Автором получены оригинальные результаты по влиянию способа нанесения дцРНК на растение, типа дцРНК, времени суток, абиотических стрессов и других факторов на эффективность сайленсинга. Полученные знания позволяют приблизиться к созданию технологии регуляции генов растений и патогенов на основе дцРНК и её применения для сельскохозяйственных растений.

Общая характеристика работы

Рукопись диссертации изложена на 117 страницах, состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение». В диссертационной работе имеются выводы и список литературы. Иллюстративный материал содержит 5 таблиц и 30 рисунков.

Обзор литературы, глава 1, написан довольно кратко и четко и не содержит лишней информации. В обзоре подробно описано разнообразие некодирующих РНК и их роль в РНК-интерференции, устойчивости растений, вторичном метаболизме и регуляции жизнедеятельности растений. Также рассмотрены методы получения дцРНК и их стабильность в различных условиях.

В главе 2 достаточно подробно представлены условия, материал и методы исследований. Для выполнения исследований выбраны распространенные адекватные цели и задачам материал и методы исследований, включающие классические молекулярные, биохимические и статистические методы.

Для реализации поставленных задач приведён достаточный объем экспериментального материала. Эффект дцРНК был проанализирован с использованием разных независимых трансгенных линий арабидопсиса.

Действие выбранных факторов оценено на нескольких уровнях, включая транскриптомный, протеомный, эпигеномный и метаболический. Авторами проведена статистическая оценка полученных изменений и показаны существенные отличия в эффективности сайленсинга генов в зависимости от времени и способа обработки растений, а также типа и концентрации дцРНК.

Следует отметить полученные интересные данные по существенному повышению эффективности сайленсинга при применении экзогенных метилированных киРНК.

Важным результатом работы является получение данных по влиянию владности почвы на эффективность дцРНК.

Все данные иллюстрированы таблицами, рисунками и графиками, что дает более полное представление о полученных результатах.

В целом диссертационное исследование Супруна А.Р. заслуживает положительной оценки, так как выполнена большая по объему, трудоемкая, грамотно в научном смысле построенная работа, завершенная важными в научном и практическом отношении результатами.

Апробация результатов работы

Материалы работы были широко представлены на международных, всероссийских и региональных конференциях.

По результатам исследований опубликованы 7 работ, из которых 6 статей в рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ и 1 работа,

опубликована в материалах международной научной конференции. Стоит отметить, что многие статьи автора опубликованы в высокорейтинговых журналах Q1.

Рекомендации по использованию результатов работы

Полученные в диссертационном исследовании результаты могут быть рекомендованы для применения в практической работе – как основа для создания новых технологий для регуляции ценных свойств растений. Кроме того, данные результаты имеют ценность для обогащения дисциплин «Генетика» и «Биохимия».

Вопросы к работе и замечания

К работе возникло ряд вопросов и замечаний:

1. Как авторы отличали специфичность подавления экспрессии трансгенов NPTII и EGFP после обработки дцРНК от неспецифического физиологического эффекта от обработки нуклеиновыми кислотами.

2. На Рис 2. и Рис.9 для обозначения длины фрагментов ДНК автор использует кДа вместо общепринятых пар нуклеотидов или тыс. п.н., что затрудняет интерпретацию данных.

3. На Рис.3 и ряде других из-за выбранной палитры плохо отличимы варианты (например, R1-Me-S+A и R1-Me-S на Рис.3).

4. Для лучшего восприятия и оценки достоверности результатов по эффекту дцРНК и киРНК на метилирование трансгенов NPTII и EGFP авторам стоило включить схематический рисунок с распределением сайтов метилирования по целевой последовательности.

5. Как показано в работе, дцРНК могут длительно сохраняться на поверхности листа. Кроме этого, в работе использованы значительные концентрации дцРНК. Поэтому возникает вопрос, не могло ли это повлиять на оценку результатов секвенирования малых РНК.

Заключение

Диссертационная работа Супруна Андрея Романовича «РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ARABIDOPSIS THALIANA L. С ПОМОЩЬЮ ЭКЗОГЕННОГО ПРИМЕНЕНИЯ IN VITRO СИНТЕЗИРОВАННЫХ РНК», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки) и 1.5.4 – Биохимия (биологические науки) является законченной научно-квалификационной работой.

По актуальности темы, научному уровню, теоретической и практической значимости результатов диссертация отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335), а ее автор Супрун Андрей Романович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки) и 1.5.4 – Биохимия (биологические науки).

Отзыв на диссертационную работу Супруна А.Р. подготовлен к.б.н. Кировым И.В., обсужден и утвержден на заседании лаборатории маркерной и геномной селекции растений от 04 ноября 2022 года (протокол № 3).

Кандидат биологических наук по специальности
03.02.07 Генетика,
старший научный сотрудник лаборатории
маркерной и геномной селекции растений
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Всероссийский научно-
исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии»,


Киров Илья Владимирович

Подпись Кирова И.В. заверяю
Ученый секретарь ФГБНУ ВНИИСБ
«29» ноября 2022 г.


Е.И. Федина

127550 Москва, улица Тимирязевская, дом 42
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ). Телефон: +7 495 9766544. E-mail:
iab@iab.ac.ru

Сведения о ведущей организации

По диссертационной работе Супруна Андрея Романовича «Регуляция экспрессии генов *Arabidopsis thaliana* L. с помощью экзогенного применения *in vitro* синтезированных РНК», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6 биотехнология и 1.5.4 – биохимия (биологические науки).

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»
Сокращенно наименование организации в соответствии с уставом	ФГБНУ ВНИИСБ
Адрес организации (с индексом)	Москва, Тимирязевская 42, 127550
Официальный сайт организации	http://vniisb.ru/
Адрес электронной почты	iab@iab.ac.ru
Сведения о профильном структурном подразделении	Лаборатория маркерной и геномной селекции растений
Составитель отзыва	Киров Илья Владимирович, старший научный сотрудник лаборатории маркерной и геномной селекции растений, кандидат биологических наук
Список основных публикаций по теме рассматриваемой диссертационной работы рецензируемых научных журналах за последние 5 лет	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Kirov, I. V., Kiseleva, A. V., Van Laere, K., Van Roy, N., & Khrustaleva, L. I. (2017). Tandem repeats of <i>Allium fistulosum</i> associated with major chromosomal landmarks. <i>Molecular Genetics and Genomics</i>, 1-12 (IF – 2.6). 2. Saint-Oyant, L. H., Ruttink, T., Hamama, L., Kirov, I., Lakhwani, D., Zhou, N. N., ... & Geest, H. (2018). A high-quality genome sequence of <i>Rosa chinensis</i> to elucidate ornamental traits. <i>Nature plants</i>, 1. (IF 11.3) 3. Filippova, A., Lyapina, I., Kirov, I., Zgoda, V., Belogurov, A., Kudriaeva, A., ... & Fesenko, I. (2018). Salicylic acid influences the protease activity and posttranslation modifications of the secreted peptides in the moss <i>Physcomitrella patens</i>. <i>Journal of Peptide Science</i>, e3138. 4. Fesenko, I., Azarkina, R., Kirov, I., Kniazev, A., Filippova, A., Grafaskaia, E., ... & Lyapina, I. (2019). Phytohormone treatment induces generation of cryptic peptides with antimicrobial activity in the Moss <i>Physcomitrella patens</i>. <i>BMC Plant Biology</i>, 19(1), 9. 5. Kirov, I., Pirsikov, A.; Milyukova, N.; Dudnikov, M.; Kolenkov, M.; Gruzdev, I.; Siksin, S.; Khrustaleva, L.; Karlov, G.; Soloviev, A. Analysis of Wheat Bread-Making Gene (<i>wbm</i>) Evolution and Occurrence in Triticale Collection Reveal Origin via Interspecific Introgression into Chromosome 7AL. <i>Agronomy</i> 2019, 9, 854. 6. Kirov, I., Omarov, M., Merkulov, P., Dudnikov, M., Gvaramiya, S., Kolganova, E., ... & Soloviev, A. (2020). Genomic and Transcriptomic Survey Provides New Insight into the Organization and Transposition Activity of Highly Expressed LTR Retrotransposons of Sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.). <i>International journal of molecular sciences</i>, 21(23), 9331. 7. Kirov, I., Dudnikov, M., Merkulov, P., Shingaliev, A., Omarov, M., Kolganova, E., ... & Soloviev, A. (2020). Nanopore RNA sequencing revealed long non-coding and LTR retrotransposon-related RNAs expressed at early stages of triticale SEED development. <i>Plants</i>, 9(12), 1794. 8. Kirov, I., Merkulov, P., Dudnikov, M., Polkhovskaya, E., Komakhin, R. A., Konstantinov, Z., ... & Soloviev, A. (2021). Transposons Hidden in <i>Arabidopsis thaliana</i> Genome Assembly Gaps and Mobilization of Non-Autonomous LTR Retrotransposons Unravelling by Nanotei Pipeline. <i>Plants</i>, 10(12), 2681. 	

9. **Kirov, I., Polkhovskaya, E., Dudnikov, M., Merkulov, P., Vlasova, A., Karlov, G., & Soloviev, A. (2021).** Searching for a Needle in a Haystack: Cas9-Targeted Nanopore Sequencing and DNA Methylation Profiling of Full-Length Glutenin Genes in a Big Cereal Genome. *Plants*, 11(1), 5.
10. **Sidorova, T., Miroshnichenko, D., Kirov, I., Pushin, A., & Dolgov, S. (2021).** Effect of grafting on viral resistance of non-transgenic plum scion combined with transgenic PPV-Resistant rootstock. *Frontiers in plant science*, 56.

Директор ФГБНУ ВНИИСБ,
профессор, д.б.н.,
академик РАН



Г.И. Карлов