



Plant
Health
Institute
Montpellier

Review

of a foreign scientific supervisor of the PhD dissertation of Alyona Alexandrova “Identification of Potato Virus S proteins suppressing RNA-interference of plant cells for obtaining of potato plants with elevated resistance against Carlaviruses”

RNA interference (RNAi) is an evolutionarily conserved mechanism that regulates gene expression and defends most eukaryotic organisms against invasive nucleic acids such as transposons, transgenes and viruses. Viruses have evolved various mechanisms of RNAi evasion and suppression. In plants, most viruses possess suppressor proteins that target different components of the RNAi machinery. Furthering our understanding of the molecular mechanisms underlying plant RNAi-based defences and viral suppressor protein-based counter-defences should contribute to development of effective methods of prevention and control of viral diseases as well as curing diseased plants of viral pathogens. In the case of vegetatively-propagated crop plants such as potatoes, tissue culture methods enable virus elimination but cannot prevent new infections. Boosting antiviral RNAi in stably-transformed transgenic crop plants is the most promising approach to prevent new infections.

The main objectives of Alyona Alexandrova's thesis work was to identify potential suppressor proteins encoded by potato virus S (PVS), a single-stranded RNA virus of the genus *Carlavirus*, and to develop an RNAi-based transgenic approach to cure field cultivars of potato plants infected with PVS and a related carlavirus potato virus M (PVM) and render the cured plants resistant against new carlavirus infection.

Cultivated potato (*Solanum tuberosum*) is the world's third most important food crop after wheat and rice. Vegetative propagation of potatoes via seed tubers results in the accumulation and spread of viral pathogens that can result in up to 75% yield losses. More than 40 different viruses are known to infect cultivated potatoes. In the course of the PhD studies, Alyona and her colleagues first performed field surveys using ELISA and RT-PCR methods and established that the carlaviruses PVS and PVM are the most widespread and economically important potato viruses in Kazakhstan, followed by potato virus Y (PVY, genus *Potyvirus*) and potato virus X (PVX, genus *Potexvirus*). PVS was most commonly detected in mixed infections with PVM and/or PVX, while PVM was prevalent both in single infections and coinfections with PVS, PVY, or both PVS and PVY. The complete genome of a Kazakh isolate of PVS was cloned and sequenced. The results of these studies were published in International Journal of Biology and Chemistry with Alyona Alexandrova as the first author. Following analysis of the PVS genome sequence, Alyona subcloned coding sequences of potential suppressor proteins (25K, 12K, 7K and CP) in expression cassettes and tested them for suppressor activity in a classical transient expression system in leaves of the GFP-transgenic *Nicotiana benthamiana* 16c line. As a result, the viral proteins did not exhibit any substantial suppression of RNAi. Next, Alyona subcloned the 25K and CP encoding sequences as inverted repeats separated by an intron under the control of constitutive promoter and terminator and used the resulting



constructs for stable transformation of both virus-free and carlavirus-infected field cultivars of potatoes, followed by a 3-year field trial of the resulting transgenic lines. After the 3rd year of field trial, 20 transgenic lines remained free of carlavirus infection. Molecular analysis of selected 25K-transgenic lines using blot hybridization analysis and Illumina sequencing of small RNA populations confirmed their carlavirus-free status and revealed robust expression of transgene-derived small interfering RNAs of three size-classes (21, 22 and 24 nt) exclusively from the PVS 25K inverted repeats, which appeared to render RNAi-based immunity to carlavirus infection. This molecular analysis was performed during a 2-month visit of Alona Alexandrova at the CIRAD-INRAE-SupAgrojoint research unit BGPI (Biology and Genetics of Plant Pathogen Interactions) in Montpellier, France (now named Plant Health Institute Montpellier, or PHIM). During this scientific and training visit Alyona Alexandrova showed her competences and high qualifications in plant molecular virology and acquired more advanced methods such as small RNA-blot hybridization analysis. Following the visit and bioinformatics analysis of Illumina sequencing data, Alyona together with her colleagues in Kazakhstan and collaborators in France wrote a joint paper, which was published in 2022 in a reputed peer-reviewed journal International Journal of Molecular Sciences (IF = 6.2) with Alyona as the first author.

In conclusion, the work of Alyona Alexandrova was conducted in accordance with all the standards and requirements of PhD dissertations and thus she deserves to obtain a PhD degree in Biotechnology.

Mikhail M. Pooggin



11/09/2022 Montpellier

INRAE Research director

Leader of the team DefensiRNA

Plant Health Institute Montpellier

<https://umr-phim.cirad.fr/en/research/virus-vector-plant-interactions-virom/defensirna-group>

Отзыв
зарубежного научного консультанта
на PhD-диссертацию Александровой Алёны на тему:
«Идентификация белков S-вируса картофеля, супрессирующих РНК-интерференцию, для получения растений, устойчивых к карлавирусам»

РНК-интерференция (РНКи) – это эволюционно консервативный механизм, регулирующий экспрессию генов и защищающий большинство эукариотических организмов от агрессивных нуклеиновых кислот, как то транспозонов, трансгенов и вирусов. Вирусы развили различные механизмы обхода и супрессии РНКи. Если речь идёт о растениях, большинство вирусов имеют белки-супрессоры, направленные на воздействие на различные составляющие механизма РНКи. Понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе принципов защиты на основе РНКи и контрзащиты на основании вирусных белков-супрессоров, углубляется благодаря развитию эффективных методов предотвращения и контроля вирусных болезней, а также оздоровления растений, заражённых вирусными патогенами. В случае сельскохозяйственных растений, размножающихся вегетативным способом, таких как картофель, методы с использованием культуры тканей позволяют уничтожить вирус, но не предотвратить новые заражения. Усиление противовирусной РНКи в стабильно трансформированных трансгенных сельскохозяйственных растениях – наиболее многообещающий подход к предотвращению новых заражений (инфекций).

Основные цели диссертационной работы Алёны Александровой – идентификация потенциальных белков-супрессоров, кодируемых S-вирусом картофеля (PVS), одноцепочечным РНК-содержащим вирусом из рода карлавирусов, а также развитие основанного на РНКи трансгенного подхода к лечению полевых сортов картофеля, заражённых PVS и связанным с ним карлавирусом – M-вирусом картофеля (PVM) и обеспечение устойчивости выведенных растений к новому заражению карлавирусами.

Картофель (*Solanum tuberosum*) – это третья по важности пищевая культура после пшеницы и риса. Размножение картофеля вегетативным способом (при помощи семенных клубней) приводит к накоплению и распространению вирусных патогенов, которые могут привести к потере урожая (до 75%). Известно более 40 различных вирусов, поражающих картофель. В течение своих PhD-исследований Алёна и её коллеги вначале провели полевые изыскания, используя методы ИФА и ПЦР в режиме реального времени, и выяснили, что карлавирусы PVS и PVM – наиболее распространённые и экономически важные вирусы картофеля в Казахстане; за ними следует Y-вирус картофеля (PVY, из рода *Potyvirus*) и X-вирус картофеля (PVX, из рода *Potexvirus*). PVS наиболее часто обнаруживался в случаях смешанных инфекций вместе с PVM и/или PVX, тогда как PVM преобладал в случаях однократных инфекций и коинфекций вместе с PVS, PVY или ими обоими. Полный геном казахстанского изолята PVS был клонирован и секвенирован. Результаты этих исследований были опубликованы в *International Journal of Biology and Chemistry*, с Алёной Александровой в качестве первого автора. После анализа последовательности генома PVS Алёна провела субклонирование кодирующих последовательностей потенциальных белков-супрессоров (25K, 12K, 7K и CP) в экспрессионные кассеты и протестировала их на супрессорную активность при помощи классической системы временной экспрессии в трансгенной линии 16с листьев табака *Nicotiana benthamiana* с использованием зелёного флуоресцентного белка. В результате вирусные белки не демонстрировали значительной супрессии РНКи. Затем Алёна провела субклонирование кодирующих последовательностей 25K и CP как инвертированных повторов, разделённых интроном, под

/Логотипы организаций/

контролем конститутивного промотора и терминатора и использовала получившиеся конструкции для стабильной трансформации как не заражённых вирусами, так и заражённых карлавирусами растений картофеля, после чего последовали 3-летние полевые испытания получившихся трансгенных линий. После 3 лет полевых испытаний 20 трансгенных линий остались незаражёнными карлавирусной инфекцией. Молекулярный анализ выбранных трансгенных линий с 25К-трансгеном при помощи блот-гибридизации и метода Illumina (секвенирование небольших популяций РНК) подтвердил, что они не были заражены карлавирусами, и продемонстрировали устойчивую экспрессию полученных из трансгенов небольших интерферирующих РНК трёх категорий размера (21, 22 и 24 нуклеотида) исключительно из инвертированных повторов 25К PVS, что, судя по всему, обеспечивало иммунитет к карлавирусной инфекции на основе РНКи. Этот молекулярный анализ был проведён во время 2-месячного визита Алёны Александровой в отдел совместных исследований по вопросам биологии и генетики патогенов растений (Biology and Genetics of Plant Pathogen Interactions) Центра международного сотрудничества в области сельскохозяйственных исследований с целью развития (CIRAD) и Национального института сельскохозяйственных исследований Франции (INRAE) в Монпелье, Франция (текущее название – Институт здоровья растений Монпелье, Plant Health Institute Montpellier). Во время этого визита в целях научных исследований и обучения Алёна Александрова продемонстрировала свои навыки и высокий уровень квалификации в области молекулярной вирусологии растений и получила доступ к более продвинутым методам, как то анализ небольших популяций РНК при помощи блот-гибридизации. После визита и биоинформатического анализа данных секвенирования при помощи метода Illumina Алёна вместе со своими коллегами в Казахстане и сотрудниками во Франции написала совместную работу, опубликованную в 2022 году в известном рецензируемом вестнике – *International Journal of Molecular Sciences* (импакт-фактор – 6,2), будучи указанной как первый автор.

В заключение, работа Алёны Александровой была проведена в соответствии со всеми стандартами и требованиями к кандидатским диссертациями; следовательно, она заслуживает присвоения степени доктора философии (PhD) в области биотехнологии.

Михаил М. Пугин /подпись/
(Mikhail M. Pooggin)

11.09.2022, Монпелье

Директор Национального института
сельскохозяйственных исследований Франции
по вопросам исследований
Руководитель группы DefensiRNA
Институт здоровья растений Монпелье
<https://umr-phim.cirad.fr/en/research/virus-vector-plant-interactions-virom/defensirna-group>

*/Штамп: Центр международного сотрудничества в области сельскохозяйственных исследований с целью развития * Институт здоровья растений Монпелье – TA A-120/K
Международный кампус Байарге, 34398 Монпелье, код почтовой системы CEDEX 5
Франция/*

Республика Казахстан, город Алматы
Первое ноября две тысячи двадцать второго года

Перевод документа с английского на русский язык выполнен мной, **Анибаевой Жанной Жагыпаровной**, переводчиком ИП «ALLIANCE TRANSLATION SERVICES» (Свидетельство о государственной регистрации серия 12915 № 0826249 от 28 мая 2013 года, ИИН: 850927400924)

Подпись

Анибаева Жанна Жагыпаровна

Республика Казахстан, город Алматы
Первое ноября две тысячи двадцать второго года

Я, **Нурбекова Динара Ержанбековна**, нотариус города Алматы, действующий на основании государственной лицензии № 15000313 от 12 января 2015 года, выданной Министерством юстиции Республики Казахстан, свидетельствую подлинность подписи переводчика **Анибаевой Жанны Жагыпаровны**. Личность переводчика установлена, дееспособность и полномочия проверены.

Зарегистрировано в реестре за № 1981

Взыскано: г/п 92 тенге + услуги прав.и технич. хар. 1532 тенге.

Нотариус:



Нурбекова Динара

The Republic of Kazakhstan, city of Almaty
The first of November, two thousand twenty two

Translated from English into Russian by **Zhanna Zhagyparovna Anibayeva**, a translator of ALLIANCE TRANSLATION SERVICES IE (State Registration Certificate Series 12915 No. 0826249 issued on 28 May 2013, IIN: 850927400924)

Signature /signature/

The Republic of Kazakhstan, city of Almaty
The first of November, two thousand twenty two

I, **Dinara Yerzhanbekovna Nurbekova**, a notary public of the city of Almaty, acting under the statutory license No. 15000313 issued on 12 January 2015 by the Ministry of Justice of the Republic of Kazakhstan, do hereby certify the authenticity of the signature put by translator **Zhanna Zhagyparovna Anibayeva**. Personality of the translator has been identified, ability and legal capacity have been verified.

Registered in the Register under No. 1981

Sum paid: stamp duty 92 tenge + legal and technical services 1532 tenge.

Notary public: /signature/

/official seal: The Republic of Kazakhstan, Dinara Yerzhanbekovna Nurbekova, notary public, License No. 15000313 issued on 12 January 2015 by the Ministry of Justice of the Republic of Kazakhstan/



ES7205108221101102947D953418

Нотариаттық іс-әрекеттің бірегей нөмірі / Уникальный номер нотариального действия