



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук
(УФИЦ РАН)

450054, г. Уфа, проспект Октября, 71. Тел./факс: (347)235-60-22, 284-56-52, e-mail: presidium@ufaras.ru, presid@anrb.ru
Код организации 81, ОГРН 1030204207582, ИНН 0274064870, КПП 027601001

13.05.2022

№ 17101-931.1-716

На № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Врио руководителя федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор



Мартыненко В.Б.

« 13 » мая 2022г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Института биохимии и генетики
Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук
о диссертационной работе
Владимировой Анастасии Андреевны

Диссертационная работа Владимировой Анастасии Андреевны «Исследование функциональной специфичности продукта гена *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий» выполнена в лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского

федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН).

В период подготовки диссертации с 01.10.2016 г. по 30.09.2020 г. соискатель Владимирова Анастасия Андреевна обучалась в очной аспирантуре в Институте биохимии и генетики УНЦ РАН (в 2017 году организация была переименована в Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН)) по направлению подготовки 06.06.01 – биологические науки, специальность 03.01.03 – молекулярная биология. С сентября 2017 года по настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов.

В 2016 году окончила Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности «Микробиология».

Научный руководитель – Баймиев Андрей Ханифович, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Кандидатские экзамены сданы 2 июня 2017 г. (Иностранный язык (английский)), 19 июня 2017 г. (История и философия науки (биологические науки)), 16 июня 2021 г. (Генетика).

Справка о сдаче кандидатских экзаменах выдана в апреле 2022 года отделом аспирантуры УФИЦ РАН.

Тема диссертации утверждена на заседании Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, протокол № 14 от 22.11.2016 года.

По итогам обсуждения принято следующее **заключение:**

Оценка выполненной соискателем работы.

Клубеньковые бактерии (ризобии) представляют собой группу почвенных микроорганизмов, которые способны превращать инертный азот в доступную форму для растений. Процесс фиксации азота у данных микроорганизмов запускается при определенных условиях и имеет многоступенчатую регуляцию на генетическом уровне. Основным транскрипционным активатором, который запускает весь каскад реакций у ризобий, а также и у других diaзотрофных бактерий, является продукт гена *nifA*. В свободноживущем состоянии данный ген у ризобий находится в репрессированном состоянии. В ранних работах было показано, что наличие в ризобиальных клетках дополнительной копии данного гена под управлением индуцибельного и конститутивного промоторов приводила к появлению азотфиксирующей активности вне симбиоза с растением. Тем не менее, вопрос о функциональной универсальности данного гена остается открытым.

В диссертационной работе был проведен анализ гетерологичных генетических систем с участием регулятора транскрипции генов, кодирующих нитрогеназный комплекс, белка NifA среди представителей порядка *Rhizobiales*. Соискателем Владимировой А.А. были получены рекомбинантные штаммы трех родов ризобий (*Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*) с генно-инженерными конструкциями, содержащими разные филогенетические варианты гена *nifA*, и выполнен анализ функциональной активности соответствующих белков NifA. Установлено, что привнесение дополнительной экспрессирующейся копии гена *nifA* в геномы штаммов бактерий в их свободноживущем состоянии приводило к обнаружению в них азотфиксирующей активности, практически независимо от эволюционной предыстории гена *nifA* в рамках традиционной (вертикально наследуемой) филогении. Полученные соискателем Владимировой А.А. результаты находятся в согласии с представлениями о значении комбинаторных механизмов в эволюции генов азотфиксации и существенной роли в этих процессах горизонтального переноса генов.

При выполнении данной работы соискателем Владимировой А.А. было выявлено, что стабильность привнесенного вектора при многократном пассаже у клубеньковых бактерий разных родов отличалась, кроме этого среди одного рода наблюдалась штаммоспецифическая стабильность наследования.

Проведенные многочисленные исследования в области генетики азотфиксации до конца не раскрывают механизм регуляции данного процесса у диазотрофных бактерий, в том числе и у ризобий. Поэтому изучение в этой области имеет практический интерес: получение штаммов высокоэффективных клубеньковых бактерий, которые оказывают ростостимулирующее влияние, как на бобовые, так и на другие сельскохозяйственные культуры.

Личный вклад автора.

Определение темы диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научным руководителем д.б.н., доц. Баймиевым Ан.Х. Автором самостоятельно проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации. Все этапы экспериментальной работы, включая, создание генно-инженерных конструкций, трансформацию бактериальных клеток, отбор рекомбинантных штаммов, анализ азотфиксирующей активности, оценку стабильности рекомбинантных плазмид, проведение мелко-деляночных опытов проводились соискателем лично. Автор лично написал рукопись данной работы и непосредственно участвовал в подготовке материалов к публикациям и их написании, в представлении докладов на конференциях.

Степень достоверности результатов проведенных исследований.

Достоверность полученных в ходе исследования результатов подтверждена применением современных молекулярно-генетических методов и воспроизводимостью проведенных экспериментов. Полученные данные подтверждены иллюстративным материалом. Выводы полностью отражают полученные результаты.

Научная новизна.

Впервые была исследована функциональная специфичность продукта гена *nifA* среди ризобий трех родов: *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*. Получено 25

рекомбинантных штамма клубеньковых бактерий, содержащие вектор, где целевым геном были разные генетические варианты гена регулятора – *nifA*. Впервые показано, что наличие любого варианта данного гена в ризобиальных клетках под управлением индуцибельного промотора *ParaBAD* приводит к появлению азотфиксирующей активности вне растений у симбиотических азотфиксаторов. Впервые продемонстрировано, что стабильное наследование привнесенных генно-инженерных конструкций зависит от таксономической принадлежности ризобий. Показано, что не все рекомбинантные штаммы симбиотических азотфиксирующих микроорганизмов оказывают влияние на стимуляцию роста и развития растений.

Практическая значимость результатов.

Практическая значимость работы определяется тем, что знания о взаимозаменяемости отдельных *nif*-генов среди разных таксономических групп ризобий могут позволить в дальнейшем целенаправленно создавать штаммы клубеньковых бактерий с повышенной азотфиксирующей активностью. Использование таких штаммов в сельском хозяйстве позволит получать повышенные урожаи не только бобовых культур.

Полнота изложения материалов диссертации в публикациях.

По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, из которых 2 статьи индексируются в международных базах Web of Science и Scopus, 2 – в журнале, индексируемом в Scopus.

Научные статьи:

1. Баймиев Ан.Х., Акимова Е.С., Гуменко Р.С., **Владимирова А.А.**, Мулдашев А.А., Чемерис А.В., Баймиев Ал.Х. Генетическое разнообразие и филогения клубеньковых бактерий выделенных из клубеньков растений рода *Lupinaster*, произрастающих на южном Урале // Генетика. – 2019. – Т. 55. – № 1. – С. 52-59. (WoS, Scopus, ВАК, IF 0,581, Q4)
2. Баймиев Ан.Х., Гуменко Р.С., **Владимирова А.А.**, Акимова Е.С., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х. Искусственная активация экспрессии *nif*-генов у

- клубеньковых бактерий *ex planta* // Экологическая генетика. – 2019. – Т. 17. – № 2. – С. 35-42. (Scopus, ВАК)
3. Баймиев Ан.Х., **Владимирова А.А.**, Акимова Е.С., Гуменко Р.С., Мулдашев А.А., Чемерис А.В., Баймиев Ал.Х. Генетическая характеристика клубеньковых бактерий эндемичных для южного Урала видов рода *Oxytropis* (Fabaceae-бобовые) // Экологическая генетика. – 2020. – Т. 18. – № 2. – С. 157-167. (Scopus, ВАК)
4. **Владимирова А.А.**, Гуменко Р.С., Акимова Е.С., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ан.Х. Функциональная специфичность продукта гена *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий // Микробиология. – 2021. – Т. 90. – № 4. – С. 471-479. (WoS, Scopus, ВАК, IF 1,156, Q4)

Таким образом, требования по полноте опубликования основных научных результатов соблюдены. Препятствий по критериям: «Опубликованность. Количество статей в рецензируемых журналах. Количество рецензируемых журналов» для принятия диссертации к публичной защите нет.

Диссертационное исследование Владимировой Анастасии Андреевны соответствует паспорту научной специальности 1.5.7. Генетика (пункт 7 «Организация и регуляция работы гена (транскрипция, репликация, рекомбинация, трансляция и др.)»). Соответственно этому, в диссертационной работе Владимировой А.А. проведено исследование функциональной специфичности гена *nifA*, продукт которого является транскрипционным активатором *nif*-генов среди клубеньковых бактерий.

Учитывая актуальность темы диссертационной работы Владимировой Анастасии Андреевны «Исследование функциональной специфичности продукта гена *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий», её научную значимость, новизну полученных результатов, высокий теоретический и экспериментальный уровень работы, аргументированность выводов, Ученый совет ИБГ УФИЦ РАН считает, что диссертационное исследование является научно-квалификационной работой, в которой даны решения поставленных задач.

Результаты исследования достоверны. Выводы адекватны используемым методам и соответствуют поставленным задачам. Научные положения и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

Диссертационное исследование Владимировой Анастасии Андреевны удовлетворяет всем требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика и соответствует заявленной специальности, о чем свидетельствует пункт 7 «Паспорта специальности».

Диссертация рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7. Генетика в диссертационном совете 24.1.218.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Институте биохимии и генетики – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Заключение принято на заседании Ученого совета Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук. Присутствовало на заседании 18 человек. Результаты голосования:

«за» - 18 чел., против – нет, воздержались – нет, протокол № 2 от 30.03.2022 года.

Председатель Ученого совета ИБГ УФИЦ РАН,
д.б.н., профессор, член корр. РАО



 Хуснутдинова Э.К.

Ученый секретарь Ученого совета ИБГ УФИЦ РАН,
д.б.н.

 Гималов Ф.Р.