

Заключение экспертной комиссии диссертационного совета 24.1.218.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

от 15.06.2022 года (пятнадцатого июня две тысячи двадцать второго года)

(протокол № 8/1)

по принятию к защите диссертационной работы Владимировой Анастасии Андреевны «Исследование функциональной специфичности продукта гена *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика.

Председатель комиссии: д-р биол. наук, проф. Хайруллин Р.М.

Члены комиссии:

д-р биол. наук Кулуев Б.Р.

д-р биол. наук, проф. Хидиятова И.М.

Комиссия диссертационного совета 24.1.218.01 рассмотрела документы диссертационной работы о принятии к защите диссертации младшего научного сотрудника 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) Владимировой Анастасии Андреевны «Исследование функциональной специфичности продукта гена *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика.

Научный руководитель: Баймиев Андрей Ханифович, д.б.н., 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 (ИБГ УФИЦ РАН).

Комиссия пришла к следующему заключению:

1. Актуальность темы

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 ризобияльных 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 diaзотрофных 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.

2. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

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. Подготовка рукописи настоящей диссертационной работы и автореферата, а также материалов для публикаций лично проводились автором.

3. Достоверность 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, сформулированные по результатам диссертационной работы, соответствуют поставленным задачам. Основные положения диссертационной работы были представлены на российских и международных научно-практических мероприятиях, включая X Всероссийскую научную интернет-конференцию «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» (Уфа, 2016), III Пущинскую школу-конференцию «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пущино, 2016), 21-ой международную Пущинскую школо-конференцию молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2017), научной конференцию и школу молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Судак, Крым, 2017), международную научную конференцию PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Уфа, 2018), Всероссийскую научную конференцию с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» (Иркутск, 2019), IX Всероссийскую конференцию молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2019), вторую международную научную конференцию PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Саратов, 2020).

4. Научная новизна и практическая значимость

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 ризобияльных 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 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.

5. Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Автор имеет 16 печатных работ. Из них 6 статей, в том числе 4 – в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ.

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)

6. Специальность, которой соответствует диссертация

Работа «Исследование функциональной специфичности продукта гена *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий» соответствует формуле специальности 1.5.7. Генетика, биологические науки. В работе проведено исследование функциональной специфичности гена *nifA*, продукт которого является транскрипционным активатором *nif*-генов, кодирующих фермент – нитрогеназу, среди клубеньковых бактерий.

7. Ценность научных работ соискателя.

Представленные в работе результаты вносят значительный вклад в понимание процесса регуляции азотфиксации у клубеньковых бактерий трех родов: *Rhizobium*, *Ensifer* и *Mesorhizobium*. Знания о взаимозаменяемости отдельных *nif*-генов среди разных таксономических групп ризобий могут позволить в дальнейшем целенаправленно создавать штаммы клубеньковых бактерий с повышенной азотфиксирующей активностью.

8. Научная зрелость соискателя

Владимирова А.А. выполнила большую экспериментальную и теоретическую работу по изучению функциональной специфичности гена *nifA* среди клубеньковых бактерий и получила важные научные результаты, обобщив их в виде диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Владимирова А.А. самостоятельно проводила все этапы экспериментальных исследований, а также обработку и анализ результатов. Она успешно освоила современные методы молекулярно-генетического анализа и статистической обработки результатов исследования. Владимирова А.А. характеризуется целеустремленностью и трудолюбием, является сложившимся исследователем, способным самостоятельно выполнять научные исследования.

9. Проверка диссертации на заимствованного материала без ссылки на авторов.

В тексте диссертации соискатель ссылается на авторов и источники заимствования материалов и отдельных результатов, также отмечает полученные лично и (или) в соавторстве результаты, что соответствует п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842. Итоговая оценка оригинальности по системе проверки использования заимствованного материала без ссылки на автора составила 80,83% (заключение экспертной комиссии и автоматический отчет прилагаются).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Экспертная комиссия единогласно решила, что диссертационная работа Владимировой Анастасии Андреевны «Исследование функциональной специфичности продукта гена *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика представляет собой научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям п.9-11,13,14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, в диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации,

отмечено отсутствие в диссертации заимствованного материала без ссылок на авторов или источники заимствования. Диссертационная работа Владимировой Анастасии Андреевны «Исследование функциональной специфичности продукта гена *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий» может быть рекомендована к официальной защите на Диссертационном совете 24.1.218.01, по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Экспертная комиссия диссертационного совета 24.1.218.01 единогласно решила:

Рекомендовать представляемую диссертацию Владимировой Анастасии Андреевны к официальной защите на Диссертационном совете 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Утвердить официальных оппонентов, обратив внимание на их научные публикации:

Топунова Алексея Федоровича – доктора биологических наук, заведующего лабораторией биохимии азотфиксации и метаболизма азота Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт биохимии имени А.Н. Баха (119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2), тел.: +7 (495) 954-52-83, факс: +7 (495) 954-27-32, e-mail: info@fbras.ru, сайт: <https://www.fbras.ru>, директор: д.б.н., Федоров Алексей Николаевич.

Гоголева Юрия Викторовича – доктора биологических наук, заведующего лабораторией молекулярной биологии Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» (420111, г. Казань, ул. Лобачевского 2/31), тел.: +7 (843) 292-73-47, +7 (843) 292-75-35, факс: +7 (843) 292-73-47, e-mail: kibmail@kibb.knc.ru, сайт: <http://www.kibb.knc.ru>, директор: д.б.н., проф., Чернов Владислав Моисеевич.

Утвердить ведущую организацию, обратив внимание на то, что одно из основных направлений научно-исследовательской деятельности структурного подразделения, где будет проходить обсуждение, соответствует тематике диссертации соискателя:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ «ВНИИСХМ»), 196608, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, тел.: +7 (812) 470-51-00, факс: +7 (812) 470-43-62, e-mail: argiam2008@yandex.ru, сайт:

<https://arriam.ru>, директор ФГБНУ «ВНИИСХМ» д. биол. наук, Проворов Николай Александрович.

Председатель экспертной комиссии Диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук:

д-р биол. наук, проф. Хайруллин Р.М. (по специальности 1.5.4. биохимия)



Члены комиссии:

д-р биол. наук, Кулуев Б.Р. (по специальности 1.5.3. молекулярная биология)

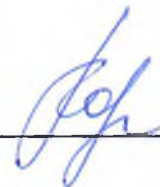
д-р биол. наук, проф. Хидиятова И.М. (по специальности 1.5.7. генетика)



Председатель диссертационного совета 24.1.218.01
д.б.н., проф. член корр. РАО Хуснутдинова Э. К.



Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.218.01
д.б.н., доцент Корытина Г. Ф.





Дата: 15.06.2022 (Пятнадцатое июня две тысячи двадцать второго года)