

ОТЗЫВ
официального оппонента доктора биологических наук
Гоголева Юрия Викторовича на диссертационную работу
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
(биологические науки)

Актуальность темы исследования

Биологическая фиксация азота является важным микробиологическим процессом восстановления молекулярного атмосферного азота и включения его в биомассу всех существующих экосистем. Осуществляет этот процесс довольно разнородная группа микроорганизмов включая бактерий, архей и цианобактерий. Наиболее эффективной азотфиксацией считается преобразование азота с участием симбиотических клубеньковых бактерий – ризобий. Как правило, данные микроорганизмы фиксируют азот только находясь в симбиозе с растением-хозяином, в то время как у свободноживущих ризобий активность азотфиксации подавлена. На генетическом уровне контроль этого процесса у бактерий осуществляется, прежде всего, продуктом гена *nifA*, который является транскрипционным активатором *nif*-генов, кодирующих ключевой фермент нитрогеназу. Несмотря на многочисленные исследования в области генетической регуляции фиксации азота, в том числе и у представителей семейства *Rhizobiaceae*, вопрос об универсальности гена-регулятора *nifA* остается нерешенным. В связи с этим, изучение функциональной специфичности продукта гена *nifA* среди ризобий является актуальным.

Научная новизна исследования

Диссертационная работа Владимировой А.А. посвящена исследованию возможности взаимозаменяемости регуляторного гена *nifA* среди ризобий, которые относятся к трем родам: *Rhizobium*, *Ensifer* и *Mesorhizobium*.

Соискателем было получено 25 рекомбинантных штаммов, содержащих различные варианты данного гена под управлением регулируемого промотора *ParaBAD*. Это позволило впервые показать, что ген *nifA* является универсальным активатором *nif*-генов среди ризобий. Все полученные рекомбинантные штаммы приобрели азотфиксирующую активность *ex planta*. При этом уровень данной активности имел зависимость от штамма бактерии-реципиента, а не от родовой принадлежности привнесенной копии исследуемого гена. Кроме того, в данном исследовании было показано, что стабильность наследования привнесенной плазмиды также значительно различается для исследуемых штаммов.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования

Результаты диссертационной работы Владимировой А.А. представляют значимый научный интерес, так как способствуют пониманию регуляции азотфиксации у симбиотических микроорганизмов. Полученные данные имеют также важное научно-практическое значение. Детальная информация о регуляции генов азотфиксации позволит целенаправленно создавать высокоэффективные штаммы ризобий, которые будут способны фиксировать азот при ассоциативном симбиозе как с бобовыми, так и небобовыми растениями, что значительно увеличит рентабельность биоудобрений, разрабатываемых на основе данных бактерий.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Диссертационное исследование выполнено на достаточном высоком научно-методическом уровне. Все научные положения, выносимые на защиту и сделанные выводы обоснованы и логично вытекают из результатов диссертационной работы. Методологические подходы, использованные Владимировой А.А., соответствуют решению поставленных задач и детально описаны, что обеспечивает воспроизводимость результатов.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационное исследование Владимировой А.А. изложено на 134 страницах машинописного текста, иллюстрировано 24 рисунками и 7 таблицами. Работа построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Перечень используемой литературы включает 256 источников, в том числе 234 иностранных работы.

Во «Введении» обоснована актуальность выбранной темы, научная новизна исследования, сформулированы цель и задачи работы, представлены научно-теоретическая и практическая значимость и положения, выносимые на защиту.

Глава «Обзор литературы» составлена логично, хорошо иллюстрирована и касается проблем, имеющих непосредственное отношение к теме диссертационной работы. В ней диссертант дает характеристику азотфиксирующим микроорганизмам, описывает структуру и механизм работы ферментного азотфиксирующего комплекса. Стоит отметить, что большое внимание было уделено генетической регуляции биологической фиксации азота на различных уровнях: транскрипционном, посттранскрипционном и посттрансляционном.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание всех экспериментальных методов данной работы, а также пояснения к выбору объектов исследования. Следует подчеркнуть, что исследование выполнено с использованием современных молекулярно-генетических подходов.

В главе «Результаты и обсуждение» представлены результаты собственных исследований диссертанта и состоит из 6 разделов, посвященных обоснованию выбора объекта исследований, анализу полиморфизма гена *nifA*, получению штаммов ризобий, путем привнесения различных вариантов гена *nifA*, исследованию влияния ортологов данного гена на изменение уровня азотфиксации у рекомбинантных штаммов

клубеньковых бактерий, определению стабильности наследования исследуемого вектора среди ризобий, а также определению ростостимулирующего влияния полученных рекомбинантов. В работе были получены интересные данные о функциональной специфичности гена-регулятора *nifA*. Так, у штаммов клубеньковых бактерий, трансформированных разными вариантами данного гена, возникала азотфиксирующая активность *ex planta*. Строгой зависимости от родовой принадлежности привнесенного гена *nifA* и самого штамма-реципиента не было выявлено, что свидетельствует об универсальности данного гена-регулятора среди исследуемой группы микроорганизмов.

В главе «Заключение» Анастасия Андреевна в краткой форме подводит итог проведенных исследований и резюмирует ключевые положения диссертационной работы.

Выводы, сделанные автором, полностью соответствуют поставленной цели, задачам и содержанию работы.

Ознакомление с авторефератом позволяет заключить, что он полностью отражает основные результаты выполненной диссертационной работы.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 16 печатных работах, из которых 4 в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Общие вопросы и замечания по работе

Существенных недостатков в работе не обнаружено, однако имеются отдельные вопросы и замечания:

1. В целом работа написана хорошим научным языком, однако не лишена опечаток и неточностей. Так, на странице 20 «редуктаза денитрогеназы» следует исправить на «редуктаза динитрогеназы»; вывод 2: «экспрессирующая копия гена» лучше заменить ««экспрессирующаяся копия гена»; вывод 5: «штаммы рода *Mesorhizobium*» вместо «род *Mesorhizobium*».

2. При описании посттранскрипционной регуляции активности гена *nifA* остается неясным о какой регуляции идет речь – позитивной или негативной. Несколько туманно описана роль РНК-азы E, которая обеспечивает процессинг трансляционно активной мРНК в комплексе с малыми некодирующими РНК и РНК-шапероном Hfq.
3. В разделе 2.2.2. метод фенольной очистки ДНК приведен в сокращенном варианте.
4. В разделе 2.2. не приведен этап обработки препаратов РНК ДНК-азой. В связи с этим вопрос: проводился ли контроль загрязнения препаратов ДНК и каким образом осуществлялся контроль загрязнения?
5. На рисунке 12 приведены результаты анализа транскрипционной активности гена *nifA* «полуколичественным» методом ОТ-ПЦР. Чем обусловлен выбор этого метода, при том, что соискатель владеет методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени?

Данные замечания в целом не противоречат положительной оценке работы и не снижают ее несомненной научно-практической ценности.

Заключение

Диссертационная работа Владимировой Анастасии Андреевны «Исследование функциональной специфичности продукта гена *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки), является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований осуществлено решение актуальной задачи, имеющей важное значение для биологической науки в целом.

По своей актуальности, научной новизне, объему экспериментальных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа полностью соответствует требованиям

п. 9-11, 13-14 установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор – Владимирова Анастасия Андреевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией молекулярной биологии Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», доктор биологических наук (специальность 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»).

12.08.2022 года

 Гоголев Юрий Викторович

Подпись Гоголева Ю.В. заверяю



Согласен на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных при работе диссертационного совета 24.1.218.01 по диссертационной работе 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 (биологические науки).

 Гоголев Юрий Викторович

Адрес места работы: 420088, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. акад. Арбузова, д. 8, литера Р, Казанский институт биохимии и биофизики –

обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук»

E-mail: gogolev.yuri@gmail.com; Тел.: +7 (843) 231-90-36, +7 (917) 916-83-81

Сайт организации: <http://www.kibb.knc.ru>