

ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора биологических наук
Топунова Алексея Федоровича 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 атмосферного азота чрезвычайно важна как с для сельского хозяйства и биотехнологии, так и с экологической точки зрения. Особенно важной является симбиотическая азотфиксация, осуществляемая симбиотической системой бобовое растение – клубеньковые бактерии. Поэтому необходимо изучение регуляции данного процесса на генетическом уровне. Диссертационная работа А.А. Владимировой посвящена исследованию универсального гена-регулятора *nifA* среди клубеньковых бактерий, принадлежащих различным родам: *Rhizobium*, *Ensifer* и *Mesorhizobium*, поэтому ее актуальность не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования

В диссертации Владимировой А.А. получены ряд новых данных, расширяющих представления о генетической регуляции азотфиксации у клубеньковых бактерий на уровне транскрипции. Было получено 25 рекомбинантных штаммов симбиотических азотфиксаторов, содержащих различные варианты гена *nifA* под управлением индуцибельного промотора. Показано, что ген *nifA* является взаимозаменяемым среди изученных штаммов ризобий. Установлено, что главную роль в изменении уровня активации *nif*-генов имеет именно штамм-реципиент, а не родовая принадлежность привнесенного гена. Отобраны рекомбинантные штаммы, обладающие ростстимулирующим действием на растения гороха и ячменя. Показано, что

стабильности наследования привнесенных плазмид различается в зависимости от родовой принадлежности штамма клубеньковых бактерий.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования

Фундаментальным аспектом диссертации Владимировой А.А. являются результаты, дополняющие представления о генетической регуляции азотфиксации среди симбиотических микроорганизмов. Работа имеет и несомненное практическое значение. Понимание регуляции и возможности комбинаций *nif*-генов позволит получать рекомбинантные штаммы с высокими показателями азотфиксации. Такие бактерии могут стать основой для создания современных биопрепаратов, использование которых послужит повышению урожайности как бобовых, так и злаковых сельскохозяйственных культур.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Диссертантом сформулированы научные положения, основывающиеся на использовании современных молекулярно-генетических методов, большом объеме исследований, и статистически обработанных данных. Это позволяет научно обосновать заключение и выводы. Результаты изложены последовательно и иллюстрированы рисунками и таблицами.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Владимировой А.А. построена по традиционному для кандидатских диссертаций плану и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Список включает 256 источников, в том числе 22 отечественных и 234 зарубежных авторов. Диссертация содержит 24 рисунка и 7 таблиц. Рассматриваемая работа оформлена в соответствии с требованиями,

предъявляемыми к кандидатским диссертациям, и изложена на 134 страницах машинописного текста.

Во введении диссертант обосновывает актуальность темы исследовательской работы, формулирует цель и задачи работы. Здесь же приведены положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования.

В обзоре литературы диссертант описывает разнообразные азотфиксирующие микроорганизмы, в том числе особенности симбиотической азотфиксации клубеньковыми бактериями. Особенно подробно описываются различные уровни генетической регуляции азотфиксации, в том числе транскрипционной и постраскрипционной. Описаны также работы по горизонтальному переносу генов у клубеньковых бактерий.

Глава «Материалы и методы исследования» посвящена описанию использованных в работе штаммов симбиотических бактерий, а также методов исследования. Использованные методы адекватны поставленным задачам, современны, показывают высокую квалификацию диссертанта, а их грамотное применение подтверждает достоверность полученных результатов.

Глава «Результаты и обсуждения» включает в себя 6 подразделов, соответствующие решаемым в диссертационной работе задачам. В первом подразделе диссертант описывает и обосновывает выбор объектов исследования. Второй подраздел включает результаты анализа полиморфизма гена *nifA* среди клубеньковых бактерий. В третьем подразделе описывается создание генно-инженерных конструкций, обоснование выбора вектора и получение рекомбинантных штаммов бактерий. Четвертый посвящен непосредственно анализу функциональной активности исследуемого гена у рекомбинантных штаммов. В следующем подразделе описываются результаты анализа стабильности наследования искусственного вектора среди симбиотических бактерий. Последний подраздел содержит сведения о

ростстимулирующем влиянии рекомбинантных штаммов ризобий на сельскохозяйственные культуры.

В заключении диссертант в краткой форме обобщает результаты проведенного исследования и расставляет наиболее значимые акценты.

Выводы, представленные в диссертации, полностью соответствуют поставленной цели, задачам и содержанию работы и непосредственно вытекают из полученных диссертантом результатов.

Среди наиболее интересных результатов, полученных в диссертационной работе Владимировой А.А., можно отметить следующие.

Показано, что существуют штаммы клубеньковых бактерий, для которых характерно наличие в геноме ортологов гена *nifA* как единственного варианта или дополнительной копии, что свидетельствует об участии данного гена в комбинаторной эволюции благодаря горизонтальному переносу генов.

Установлено, что при внесении в геном ризобий дополнительной экспрессирующей копии гена *nifA* других родов клубеньковых бактерий, они приобретают способность фиксировать азот *ex planta*. , при этом уровни азотфиксирующей активности ортологов гена *nifA* в разных штаммах ризобий зависят не от родовой принадлежности, а от штамма бактерии-реципиента.

Показано, что полученные рекомбинантные штаммы ризобий оказывают ростостимулирующим влияние на культуры гороха и ячменя.

Показано, что стабильность внесенной плазмиды у рекомбинантных штаммов ризобий зависит от родовой принадлежности штамма-реципиента. Большой стабильностью наследования внесенной плазмиды обладали штаммы рода *Ensifer*, меньшей – рода *Mesorhizobium*

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

По результатам диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для кандидатских диссертаций. Опубликованные статьи и автореферат правильно отражают суть рассматриваемой диссертации.

Результаты работы были неоднократно доложены на представительных российских и международных научных конференциях.

Общая оценка диссертации и замечания по работе

Можно сделать вывод, что диссертация Владимировой А.А. является серьезным научным исследованием, а полученные ей данные существенно обогащают такую важную область биологической науки, как изучение симбиотической азотфиксации и возможностей ее практического применения. Полученные результаты достоверны, выводы обоснованы. Работа написана хорошим литературным языком, хорошо иллюстрирована.

В то же время к рецензируемой диссертационной работе можно высказать несколько замечаний технического характера.

В работе иногда встречаются разночтения по тексту. Например, на стр. 7 (Введение) есть фраза: «...исследований по изучению регуляции азотфиксации посредством изменения экспрессии *nifA* гена НЕ ТАК МНОГО», а в следующем абзаце написано: «Несмотря на проведенные МНОГОЧИСЛЕННЫЕ исследования в области генетической регуляции азотфиксации...». Вероятно, здесь диссертант имел в виду весь пул генетических исследований, но, тем не менее, это может вызвать вопросы.

В раскрытии механизмов биологической фиксации азота участвовали многие ученые, а не только Герман Уилфарт, как написано на стр. 13, тем более, цитируемый по обзору (Galloway, 2013). Кстати, в русскоязычной литературе его фамилия традиционно пишется «Вильфарт».

Несколько странным кажется и единственная ссылка на работу (Soto-Urzuа and Vasa, 2001) при упоминании биохимической стратегии защиты нитрогеназы от кислорода, при которой синтезируется леггемоглобин (стр. 23, 3-4 строки сверху). Эта статья не является наиболее показательной по данному вопросу и, к тому же, написана на испанском языке.

На рис. 12 «Анализ транскрипционной активности гена *nifA* методом ОТ-ПЦР...» (стр. 84) кроме электрофореза, данные приведены в виде столбиков,

и размерность по оси ординат дается в «интенсивности пикселей». Эти же единицы использованы и на рис. 13 (стр. 86). Хотелось бы узнать соответствие этих единиц каким-то генетическим или биохимическим показателям.

В диссертации встречаются стилистические неточности (например, не очень удачным является выражение «свободноживущий рост», стр. 30, 15 строка сверху), и опечатки (например «ризибии» вместо «ризобии», стр. 18, 10 строка сверху). В некоторых местах отсутствуют запятые.

Отмеченные замечания являются техническими, не носят принципиального характера и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы А.А. Владимировой.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Владимировой Анастасии Андреевны на тему: «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, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи, имеющей важное фундаментальное значение для биологической науки в целом. Диссертационная работа 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 искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией биохимии азотфиксации и метаболизма азота
Федерального государственного учреждения «Федеральный

исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии
наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), Институт биохимии имени А.Н. Баха,
доктор биологических наук (специальность 03.00.04 – Биохимия)

 Топунов Алексей Федорович

25 августа 2022 года

Подпись Топунова А.Ф. заверяю

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН
К.б.н. Орловский Александр Федорович.
Тел.: 8(495)954-40-07; эл. почта: orlovsky@imbi.ras.ru



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).

 Топунов Алексей Федорович

Топунов Алексей Федорович
Адрес места работы: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2,
Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии
наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), Институт биохимии имени А.Н. Баха
Должность: заведующий лабораторией биохимии азотфиксации и
метаболизма азота
E-mail: aftopunov@yandex.ru
Тел.: +7 (495) 954-52-83
Сайт организации: <https://www.fbras.ru>