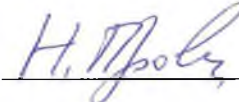


**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,
шоссе Подбельского, 3
Телефон 8-812-470-51-00
Факс 470-43-62
E-mail: arriam2008@yandex.ru

Утверждаю директор Федерального
государственного бюджетного научного
учреждения «Всероссийский научно-
исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»,
доктор биологических наук



 Н.А. Проворов

«15» августа 2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертационной работы Владимировой Анастасии Андреевны на тему: «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

Диссертационная работа Владимировой Анастасии Андреевны посвящена изучению функциональной специфичности продукта гена *nifA* среди клубеньковых бактерий. Данные микроорганизмы вносят весомый вклад в природные экосистемы, поскольку снабжают растения биологически доступным азотом. Азотфиксация для бактерий является довольно энергозатратным процессом и строго контролируется на генетическом уровне. Однако молекулярные механизмы регуляции преобразования инертной формы азота до конца не изучены. Данная работа относится к

фундаментальным исследованиям и в ней впервые были получены сведения о функциональной универсальности гена-регулятора *nifA* среди ризобий. Кроме этого, понимание механизмов регуляции генов, которые кодируют белки, участвующие в азотфиксации, позволит направленно изменять и конструировать микроорганизмы с полезными свойствами для агробιοтехнологий. Такой подход может решить проблему широкомасштабного применения минеральных удобрений, использование которых порождает развитие противоречий между величиной и качеством урожая, а также приводит к значительным неблагоприятным воздействиям на окружающую среду. Таким образом, тема диссертационной работы Владимировой А.А. является актуальной и практически значимой.

Научная новизна исследования

В диссертационной работе Владимировой А.А. впервые были получены сведения об универсальности продукта гена *nifA* у представителей клубеньковых бактерий родов *Rhizobium*, *Ensifer* и *Mesorhizobium*. Получены рекомбинантные штаммы, оказывающие положительное влияние на развитие растений гороха и ячменя. Впервые показано, что стабильность наследования привнесенной плазмиды значительно отличается среди представителей исследуемых родов ризобий.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования

Полученные диссертантом данные расширяют представление о генетической регуляции азотфиксации у симбиотических бактерий. Также результаты могут быть использованы в научных учреждениях биологического профиля, в том числе при подготовке курсов лекций по генетике, микробиологии и молекулярной биологии.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Диссертационная работа Владимировой А.А. выполнена на современном научно-методическом уровне. В исследование было взято 134 коллекционных штамма, относящихся к 3 родам клубеньковых бактерий (*Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*). В дальнейшем из них было отобрано 9

штаммов, которые подвергались трансформации генно-инженерными конструкциями, в которые были встроены разные варианты гена *nifA*. Научные положения диссертационной работы основаны на изучении большого числа фундаментальных и прикладных работ (256 источников) как отечественных, так и зарубежных авторов. Полученные результаты сопоставлены с известными опубликованными данными других исследователей. Выводы обоснованы и соответствуют поставленной цели и задачам.

Результаты диссертационного исследования прошли достаточную апробацию. По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, из которых 4 в журналах рекомендованных ВАК РФ. Также результаты исследования были представлены на научно-практических конференциях различного уровня.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Владимировой А.А. оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ и состоит из введения и 3 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение), заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Список литературы включает 256 работ отечественных и зарубежных авторов. Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 24 рисунка и 7 таблиц.

В «Введении» диссертант обосновывает актуальность исследования, а также включает описание степени разработанности темы. В этом разделе представлены цель и задачи исследования, научные положения, обозначены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Глава «Обзор литературы» включает пять разделов. Первый и второй посвящен описанию азотфиксирующих микроорганизмов и нитрогеназы. В третьем и четвертом разделе обзора представлена информация о генетике азотфиксации, включая ее регуляцию. В заключительном разделе отражены сведения о горизонтальном переносе генов среди клубеньковых бактерий. Стоит отметить, что большая часть литературных источников представлена

зарубежными публикациями, что подчеркивает важность проведенных исследований для российской науки. Таким образом, информация, представленная диссертантом в разделах обзора литературы, логично обосновывает цель и задачи диссертационной работы.

Глава «Материалы и методы исследования» содержит подробное описание объектов и методов исследования. Описаны используемые методики с ссылками на первоисточники, приведена информация об используемых реактивах и приборах.

В главе «Результаты и обсуждение» подробно описаны полученные соискателем результаты, которые представлены в 6 разделах. В первом разделе представлены результаты отбора штаммов ризобий дикого типа для проведения экспериментальных исследований. Был проведен скрининг 134 штаммов клубеньковых бактерий, и 9 штаммов из них были взяты в работу. Во втором разделе приводятся результаты сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена *nifA* среди клубеньковых бактерий. В следующем разделе обосновывается выбор вектора и создание генно-инженерной конструкции с целевым геном. В результате было получено 25 ризобиальных рекомбинантных штамма, содержащих разные ортологи гена *nifA* под управлением индуцируемого бактериального промотора *ParaBAD*. В четвертом разделе представлены результаты анализа функциональной активности исследуемого гена у полученных рекомбинантов. Было показано, что наличие дополнительной активной копии гена *nifA* приводило к появлению азотфиксирующей активности у ризобий в свободноживущем состоянии вне зависимости от родовой принадлежности привнесенного гена. В пятом разделе описываются результаты анализа стабильности наследования привнесенного вектора и показано, что различается в зависимости от родовой принадлежности микроорганизма. В последнем разделе главы представлены данные о влиянии полученных рекомбинантных штаммов с измененной регуляцией генов на рост и развитие растений.

В «Заключении» подведен общий итог проделанной работы и сформулированы общие результаты.

В «Выводах» приведено обобщение основных результатов диссертационной работы. Выводы полностью соответствуют поставленным задачам, подтверждены экспериментальными и теоретическими данными.

Тема данной диссертационной работы, основные положения и выводы полностью соответствуют специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Автореферат диссертации полностью соответствует основным положениям диссертации.

Сведения о полноте опубликованных научных трудов

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертации, были представлены на научных конференциях разного уровня.

Общие вопросы и замечания по работе

В целом диссертационная работа производит благоприятное впечатление, но, тем не менее, в ходе анализа возникли некоторые вопросы:

1. Данные о специфичности гена *nifA*, включая филогенетический анализ и данные о свойствах рекомбинантов, довольно трудно интерпретировать без анализа белковых последовательностей. Приводят ли нуклеотидные замены к существенной модификации аминокислотной последовательности? Более того, в дальнейшем развитии данного исследования можно было бы задаться вопросом и статистике синонимичных/несинонимичных замен в данном гене;

2. В дополнение к первому вопросу есть замечание о том, что в разделе Материалы и методы и на рисунке с филогенией отсутствует упоминание использованной эволюционной модели (меры различий) и алгоритма построения дерева;

3. В главе Результаты Автор противопоставляет высокую степень полиморфизма и кластеризацию (с.80 «Хотя...была выявлена высокая степень полиморфизма среди клубеньковых бактерий, все же отмечалась и филогенетическая их кластеризация...»). Необходимо отметить, что полиморфизм с кластеризацией представляют малосвязанные свойства. Могут быть «хорошие» кластеры при низком полиморфизме и при высоком, а также и наоборот;

4. Параметр «средняя интенсивность пикселей по точкам» появляется впервые в Результатах, пояснения того, о чем именно идет речь отсутствуют в Материалах и методах, поэтому приходится только догадываться о смысле этого параметра;

5. Наконец, терминология, используемая для описания полевых экспериментов, также вызывает сомнения. Нам представляется, что вместо расплывчатых терминов «развитие растений в естественных условиях» или «в природных условиях» следовало бы просто сказать, что речь идет либо мелкоделяночном эксперименте, либо о микрополевом.

Конечно, данные замечания не снижают положительную оценку работы, которая в целом оставляет прекрасное впечатление и читается с большим интересом.

Заключение

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 значение для биологической науки. Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9-14, установленным

«Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции с изменениями и дополнениями от 30 июля 2014 г., 21 апреля, 2 августа 2016 г., 29 мая, 28 августа 2017 г., 1 октября 2018 г., 20 марта, 11 сентября 2021 г.), а ее автор – Владимирова Анастасия Андреевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Диссертационная работа Владимировой А.А. и отзыв были обсуждены и одобрены на заседании лаборатории микробиологического мониторинга и биоремедиации почв ФГБНУ «ВНИИСХМ», протокол №1, от «15» августа 2022 года.

Отзыв составлен заведующим лабораторией микробиологического мониторинга и биоремедиации почв ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», кандидатом биологических наук (специальность 03.00.07 – микробиология) Андроновым Евгением Евгеньевичем.

Андронов Евгений Евгеньевич

«15» августа 2022 г.

Подпись руки Андропова Евгения Евгеньевича, ведущего научного сотрудника лаборатории микробиологического мониторинга и биоремедиации почв ФГБНУ ВНИИСХМ, кандидата биологических наук, заверяю:



начальник отдела кадров ФГБНУ ВНИИСХМ Ковалевская М.А. 15 августа 2022 года.

Сведения о составителе отзыва:

Андронов Евгений Евгеньевич

кандидат биологических наук по специальности 03.00.07 – микробиология

Должность: заведующий лабораторией микробиологического мониторинга и биоремедиации почв ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»

Адрес организации: 196608, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, д. 3

Телефон: +7 (812) 470-51-00, сайт организации: <https://arriam.ru/>

E-mail: arriam2008@yandex.ru