

Отзыв

официального оппонента – доктора биологических наук, Гоголева Юрия Викторовича на диссертационную работу Лавиной Анны Михайловны «Гены-регуляторы синтеза экзополисахаридов в формировании биопленок *Rhizobium leguminosarum*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «Микробиология»

Актуальность.

Одним из современных направлений развития экологического земледелия является создание искусственных симбиотических ассоциаций важных сельскохозяйственных культур с ризобиями. Бактерии группы PGPR стимулируют рост и развитие растений не только за счет образования биологически активных веществ, но и за счет способности к азотфиксации, улучшения водного и минерального питания растений, предотвращения или уменьшения роста фитопатогенов, благодаря возможности синтезировать вещества бактерицидного и фунгицидного действия. Несмотря на то, что всем мире широко используются биоудобрения, представляющие собой суспендированные монокультуры PGPR, выживаемость таких интродуцированных микроорганизмов в почве часто невысока. Решением этой проблемы может служить применение штаммов, способных к формированию биопленок. Такие ризобияльные штаммы обладают высокой способностью защищать себя от внешнего стресса и получают преимущества в микробной конкуренции, характерной для ризосферы. Важным свойством клубеньковых бактерий, напрямую связанным с формированием биопленок, является их способность к синтезу экзополисахаридов (ЭПС). Выработка экзополисахаридов способствует агрегации и образованию ассоциаций ризобактерий с другими микроорганизмами, адгезии к растительным тканям, а также защите клеток от действия неблагоприятных факторов окружающей среды. Все это определило актуальность диссертационного исследования Лавиной А.М., в котором затрагивается проблема формирования биопленок ризобиями и роль генов-регуляторов синтеза ЭПС в данных процессах.

Достоверность и новизна.

Оценивая новизну проведенного исследования, следует отметить следующие ключевые моменты:

Автором обнаружено, что штаммы *R. leguminosarum*, в геноме которых отсутствуют гены *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*, характеризуются скудным ослизнением по сравнению со штаммами, располагающими данными генами.

Получены 12 ризобияльных штаммов, рекомбинантных по генам *pssA* и *rosR*, меченных флуоресцентным белком GFP, а также 5 штаммов рекомбинантных по гену *pssB*.

Выявлено, что наличие в геноме штаммов *R. leguminosarum* дополнительной копии гена *pssA* или *rosR* положительно влияет на эффективность образования биопленок, а дополнительная копия гена *pssB*, наоборот, уменьшает толщину биопленок.

В отношении исследуемых диких и рекомбинантных штаммов проведена оценка зависимости биопленкообразования от числа живых клеток. Выявлена корреляция между толщиной биопленок и концентрацией Ca^{2+} и питательных веществ в культуральной среде, а также температурным режимом.

Проведены микроскопические исследования структур, образованных ризобияльными штаммами на инертных поверхностях и корнях растений.

Собрана коллекция ризобияльных штаммов, обладающих ростостимулирующей активностью.

В связи с этим, диссертационное исследование Лавиной А.М., посвященное изучению молекулярных механизмов инициации и формирования биопленок ризосферными бактериями на поверхности корней растений в ассоциативных симбиозах путем использования в качестве модификаторов данных процессов генов-регуляторов путей синтеза экзополисахаридов ризобактерий, следует рассматривать как современное и важное с точки зрения фундаментальных и прикладных позиций.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.

Диссертация А.М. Лавиной является цельной, законченной работой с четко поставленными целью и задачами. Основные положения диссертации и выводы, основываются на значительном объеме проведенных молекулярно-генетических и микробиологических исследований. Экспериментальный материал изложен последовательно, снабжен информативными иллюстрациями. Статистическая достоверность представленных результатов экспериментов убедительно продемонстрирована. Выносимые на защиту положения диссертации достаточно подробно обсуждены в публикациях, а также на международных и российских конференциях. Таким образом, достоверность полученных результатов исследования, степень обоснованности положений и заключения, сформулированных в диссертации, не вызывают сомнений.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций.

В качестве фундаментального аспекта работы следует рассмотреть то, что полученные в диссертационной работе результаты расширяют представление о процессах биопленкообразования ризобиями. Реализация прикладного аспекта связана с тем, что исследованная коллекция штаммов ризобактерий, обладающих ростостимулирующей активностью, может быть рекомендована как основа для создания биопрепарата,

стимулирующего рост и развитие растений. Автором показано, что применение подхода, основанного на модификации процессов инициации и формирования биопленок ризобиями, путем использования генов-регуляторов биосинтеза ЭПС ризобий – является перспективным направлением создания стабильных ассоциаций экономически ценных видов растений с ризобиями.

Структура и содержание диссертации, ее завершенность.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 198 страницах, рукопись содержит 57 рисунков и 11 таблиц. Список литературы включает 257 наименований работ, в том числе 28 отечественных и 229 зарубежных авторов.

Во введении обосновывается актуальность выбранной темы для исследовательской работы, представлены цель, задачи, сформулированы положения, выносимые на защиту, представлена структура диссертации и отмечен личный вклад автора диссертационной работы. Обозначены научно-практическая значимость и новизна диссертационной работы.

В литературном обзоре достаточно подробно представлены современные представления по теме, которой посвящено исследование и актуальные вопросы.

Материал, изложенный в главе об объектах и методах исследования, позволяет получить исчерпывающую информацию об объектах и использованных современных молекулярно-биологических и микробиологических методах. Полученные результаты подвергались статистической обработке согласно общепринятым критериям.

Глава результаты исследований и их обсуждение включает 5 разделов, которые посвящены: идентификации генов ЭПС, получению штаммов клубеньковых бактерий, трансформированных генами-регуляторами формирования биопленок; проведению микроскопических исследований структур, образуемых ризосферными бактериями; анализу влияния факторов окружающей среды на формирование биопленок ризобияльными штаммами; а также определению ростостимулирующего эффекта, оказываемого на растения ризосферными штаммами, синтезирующими различные модуляторы механизмов формирования биопленок на поверхности корней.

В заключении автор резюмирует полученные результаты и обсуждает наиболее проблемные моменты их интерпретации. Труд завершается достаточно информативными выводами, соответствующими поставленным задачам.

Таким образом, рецензируемая диссертация представляет собой целостное исследование, которое обладает внутренним единством, содержит научные результаты ценные для науки и практики.

Подтверждение опубликования основных результатов в научной печати. Все материалы диссертации опубликованы в печати. В списке публикаций содержится 35 работ, в том числе 13 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, из них 6 статей – индексируемые в базах Web of Science или Scopus.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в достаточной мере отражает основные положения диссертационной работы.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, оценка научной работы соискателя в целом, замечания по работе, вопросы.

В ходе рецензирования диссертационной работы к соискателю появились следующие вопросы:

Из текста диссертации остается неясным, чем объясняется использование в количественной ОТ-ПЦР в качестве референсного гена, именно ген, кодирующий белок, необходимый для гомологичной рекомбинации? Насколько известно, в качестве референсных выбираются гены, обладающие максимальной стабильностью активности в условиях эксперимента. Было ли проведено сравнение активности гена *recA* с активностью других генов домашнего хозяйства в исследуемых экспериментальных условиях?

Автором получен обширный материал о наличии генов, отвечающих за синтез ЭПС и у широкого круга бактериальных штаммов. Представлены таблицы обнаружения исследуемых генов у данных микроорганизмов. Однако, было бы полезным суммировать данные в обобщающей таблице, содержащей список штаммов и указание на наличие или отсутствие у них соответствующих генов. Для экономии объема рукописи это можно сделать в качестве приложения. Такая таблица облегчила бы поиск взаимосвязи свойств бактерий с наличием или отсутствием у них определенных генов интереса.

В своей работе автор сделал упор на анализ изменения параметров и свойств бактерий, вызванных сверхэкспрессией генов интереса. В тоже время, представляется актуальным изучать эти показатели в условиях комплементации отсутствующих признаков (генетических детерминант). Наиболее эффективно это было бы провести на мутантах по изучаемым генам. Однако, учитывая, что получение мутантов для немодельных организмов является достаточно трудоемким процессом, для подобных работ можно было бы подобрать природные штаммы, у которых отсутствуют отдельные гены интереса при сохранении соответствующего генетического бэкграунда. Может ли автор выделить подобные штаммы из собранной коллекции для перспективных исследований?

Заданные вопросы не умаляют значимости диссертационной работы, носят дискуссионный характер и должны быть учтены в дальнейших исследованиях.

Заключение о соответствии диссертации и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 в последней редакции.

Диссертационная работа Лавиной Анны Михайловны по объёму и научно-методическому уровню выполненных исследований является законченной научно-квалификационной работой, отражающей новые фундаментальные знания, которые вносят существенный вклад в область исследования – симбиоз микроорганизмов и растений. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, а также достоверности полученных результатов, диссертационная работа Лавиной А.М. соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 в последней редакции, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «Микробиология»

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».

14.03.2022 г.

Гоголев Юрий Викторович

Россия, Республика Татарстан,
420088 г. Казань, ул. Академика Арбузова, д. 8, Литера Р
тел.: +7 (843) 2319036; e-mail: gogolev.yuri@gmail.com

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской
академии наук»; <http://www.kibb.knc.ru/>

Подпись Гоголева Ю.В. заверяю:

