

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Сулима Антона Сергеевича "**ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНА ЛУКХ, ОПРЕДЕЛЯЮЩЕГО СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.) С КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM***", представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Актуальность темы исследования.

Настоящая работа посвящена изучению важнейшего процесса в биологическом круговороте азота – биологической азотфиксации. Исследование молекулярных механизмов взаимоотношения растений и азотфиксирующих микроорганизмов является важной предпосылкой для использования процессов азотфиксации в сельскохозяйственной практике. Генетические и молекулярно-биологические основы взаимодействия растений-хозяев с азотфиксирующими бактериями являются важнейшим элементом системы знаний, необходимых для эффективного использования природных свойств сельскохозяйственных объектов, к каковым относится и объект настоящего исследования – посевной горох. У гороха механизм распознавания азотфиксирующего микросимбионта, по всей видимости, является более сложным и включает больше генов, чем у других бобовых, поэтому объект данного исследования не только является хозяйственно-ценной культурой, но и позволяет исследовать процессы, которые невозможно изучить на классических модельных объектах, люцерне слабоусеченной и лядвенце японском.

Научная новизна работы.

Настоящая работа посвящена детальному исследованию генетической основы формирования признака повышенной избирательности растений гороха в выборе микросимбионта. Эта избирательность выражается в способности растений-хозяев вступать в симбиоз лишь с отдельными редкими штаммами

ризобий, которые отличаются дополнительными модификациями симбиотической сигнальной молекулы. Описан ранее неизвестный ген, обозначенный *LykX*, определена его полная нуклеотидная последовательность и описана его функция в клубеньковом симбиозе. На основании совокупности данных, полученных в результате применения комплекса современных методов молекулярной биологии и классической генетики, с высокой степенью вероятности новый ген *LykX* идентифицирован с ранее известным геном *Sym2*, для которого еще в прошлом веке было описано фенотипическое проявление, но первичная структура так и оставалась нерасшифрованной.

Практическая значимость.

Полученные в настоящем исследовании новые знания о молекулярно-генетической природе одного из факторов, определяющих специфичность бобово-ризобиального симбиоза, могут быть использованы в сельскохозяйственной практике для создания наиболее эффективных пар растений-хозяев и азотфиксирующих бактерий для более полного использования микробиологического потенциала почв и создания устойчивых сбалансированных экосистем.

Структура и основное содержание работы.

Настоящая диссертационная работа состоит из Введения, 4-х глав, Заключения, Выводов, списка литературы и Приложения, включающего 6 таблиц и 4 рисунка.

Первая глава представляет собой обзор литературы, в котором детально рассмотрены генетические и молекулярно-биологические основы симбиоза растений и микроорганизмов – грибов арбускулярной микоризы и азотфиксирующих бактерий. Подробно описаны известные гены гороха, которые участвуют в установлении и функционировании симбиоза.

Вторая глава дает описание растительного материала и бактериальных штаммов, использованных в работе, а также описание методов анализа фенотипа растений и молекулярно-биологических и биоинформатических процедур.

Третья глава – Результаты, последовательно излагает проведенные этапы работы, представленные в виде восьми подглав.

Подглава первая описывает поиск и обнаружение в коллекционных образцах гороха линий, обладающих высокой избирательностью к микросимбионту (так называемый "афганский" фенотип). Описан тест на аллелизм детерминант симбиотического фенотипа у новых и ранее известных «афганских» линий и показано, что вновь обнаруженные формы аллельны ранее известным. Тем самым расширен доступный спектр генетической изменчивости по гену, изучаемому в данной работе, что является необходимой предпосылкой для генетического анализа.

Во второй подглаве описано обнаружение и дана характеристика структуры ранее неизвестного гена, кодирующего рецептор-подобную киназу. Проведен сегрегационный анализ, который показал что вновь обнаруженный ген тесно сцеплен с ранее известным симбиотическим геном *Sym37*, который расположен на генетической карте гороха в районе локализации *Sym2*, гена, контролирующего повышенную избирательность в отношении микросимбионта, известного лишь по его фенотипическому проявлению, но с неизвестной первичной структурой. Тем самым были получены основания считать вновь обнаруженный ген, обозначенный *LukX*, перспективным кандидатом на роль *Sym2*.

В третьей подглаве описан скрининг геномной библиотеки гороха, выделение ВАС-клона, содержащего три тесно сцепленных гена рецепторных киназ, и определение полной нуклеотидной последовательности выделенной геномной вставки, в том числе изучаемого гена *LukX*. Подтвержден факт экспрессии гена в азотфиксирующих клубеньках как анализом сборок транскриптома, так и непосредственно с использованием количественной ПЦР в реальном времени. Показано, что сильнее всего *LukX* экспрессируется в неинокулированных корнях, в то время как в клубеньках уровень его экспрессии снижается до близких к нулю значений. Тем самым автор приходит к

заклучению, что паттерн экспрессии указывает на вероятное участие гена *LykX* в ранних этапах установления клубенькового симбиоза.

В четвертой подглаве описано определение полной нуклеотидной последовательности кодирующей части гена, а также 5'- и 3'-некодирующих участков кДНК. Показано, что ген включает 12 экзонов и 11 интронов. Дается описание кодируемого белка на основании теоретической аминокислотной последовательности. Показано, что белок *LykX* имеет структуру, типичную для рецепторных киназ, он состоит из рецепторного домена, включающего три так называемых *LysM*-модуля, трансмембранного домена и киназного домена. Проведен филогенетический анализ аминокислотных последовательностей гомологичных рецепторных киназ гороха и родственных бобовых растений. Позиция белка *LykX* на филогенетическом дереве позволила сделать вывод, что этот белок уникален для гороха. Описано секвенирование первого экзона гена *LykX* у растений 13 линий, которое выявило наличие нуклеотидных замен, характерных исключительно для аллелей, встреченных в линиях с высокой избирательностью к структуре *Nod*-фактора. Сделан вывод, что две группы аллелей с повышенной избирательностью к микросимбионту сформировались независимо друг от друга.

Пятая подглава описывает поиск индуцированных локальных нарушений путем скрининга коллекции мутантов, полученных обработкой этилметансульфонатом, доступной на коммерческой основе. В результате скрининга коллекции при помощи ПЦР и последующего секвенирования были выявлены мутантные семьи, несущие мутации в последовательности гена *LykX*.

Подглава 6 описывает симбиотический фенотип отобранных мутантов *lykX*, происходящих из семи мутантных семей. Показано, что все мутанты демонстрировали сниженное количество клубеньков по сравнению с диким типом, зачастую клубеньки имели атипичную форму. Проведен микроскопический анализ корней на стадии, предшествующей непосредственной инфекции, проведен подсчет числа корневых волосков и определен процент

скрученных корневых волосков. На основании проведенного анализа делается вывод, что число и скрученность корневых волосков не связаны с мутациями в гене *lykX*, и, таким образом, нарушение функции *LykX* не приводит к нарушению начальных этапов установления клубенькового симбиоза. С использованием микроскопического анализа проведена оценка количества так называемых инфекционных событий – ранних этапов инфекции, начиная от образования микроколонии в изгибе скрученного корневого волоска и заканчивая проникновением инфекционной нити в клетки коры корня. Выявлены многочисленные аномалии в строении инфекционных нитей. Показано, что из семи изученных мутантов у шести достоверно повышено число инфекционных событий. Сделан вывод, что мутация в гене *LykX* не влияет на самые ранние этапы клубенькового симбиоза, но проявляется на более поздних стадиях, что полностью соответствует представлениям о роли гена *Sym2* в клубеньковом симбиозе.

Подглава 7 описывает ключевой момент в установлении соответствия между выявленным на молекулярном уровне геном *LykX* и известным на уровне фенотипа геном *Sym2* – тест на аллелизм. Мутантная линия *lykX* 1645 была скрещена с линией Caméor, имеющей обычную избирательность к микросимбионту, и коллекционными образцами, несущими мутации в гене *Sym2* и характеризующимися повышенной избирательностью к структуре Nod-фактора. После инокуляции *nodX*⁻ штаммом ризобий у гибридов F1 проводили подсчет образовавшихся клубеньков. Полученные данные позволили сделать вывод, что мутантная линия 1645 действительно несет аллель гена *Sym2*, определяющий повышенную избирательность к Nod-фактору.

Подглава 8 описывает оценку полиморфизма первого экзона гена *LykX*, соответствующего рецепторному домену белка. На основании данных секвенирования данного участка у трех генов, кодирующих рецепторные киназы, у 100 образцов гороха построены филогенетические деревья и описаны основные

гаплогруппы, вероятно, представляющие изоформы рецепторов, различающиеся по аффинности к лиганду.

В главе 4 диссертации дается обсуждение полученных данных в свете механизмов рецепции бактериального сигнала растениями макросимбионта. Открытый более 80 лет назад феномен повышенной избирательности к Nod-фактору, контролируемый геном *Sym2*, помог открыть принципы взаимодействия бобовых растений и ризобий, однако молекулярные основы самого фенотипа долгое время оставались неизвестными. Все данные, полученные в настоящей работе, свидетельствуют в пользу того, что *LykX* – это действительно *Sym2*, при этом нет ни одного факта, противоречащего этой гипотезе. Предложена модель распознавания структуры Nod-фактора рецепторными киназами гороха.

Заключение к диссертационной работе определяет значение полученных результатов для понимания молекулярных основ симбиогенеза в свете концепции «адаптивного земледелия», предполагающей максимально полное использование микробиологического потенциала почв и создание высокоэффективных комплементарных пар симбионтов, а также в свете глобальной проблемы баланса симбиотических систем.

Результаты суммированы в шести выводах.

Замечания.

1. Основным замечанием по данной работе является слишком категоричная формулировка вывода номер 6: "установлена тождественность генов *LykX* и *Sym2*". Как справедливо отмечает автор, "Все данные, полученные к настоящему моменту, свидетельствуют в пользу того, что *LykX* – это действительно *Sym2*, при этом нет ни одного факта, противоречащего этой гипотезе." В этой связи считаю более правильной формулировку, как в "Положениях, выносимых на защиту": "Ген *LykX* обладает всем комплексом необходимых признаков для признания его тождественным гену *Sym2*". Весьма убедительным аргументом в пользу тождественности указанных генов является тест на аллелизм, однако, линия, несущая индуцированные мутации, которая участвовала в комплементационном

тесте, несет еще неизвестное число мутаций. Поэтому с уверенностью можно утверждать лишь то, что изученная линия действительно несла мутантный аллель гена *Sym2*. Для большей убедительности вывода стоило провести схожий тест на аллелизм также с участием растений из остальных мутантных семей.

2. В разделе, посвященном анализу корреляции между "афганским" фенотипом и изменчивостью гена *LukX*, исследована первичная структура первого экзона указанного гена, соответствующего рецепторному домену, однако, выводы распространяются на весь ген. Например, автор утверждает, что "Бесспорным является лишь то, что «европейскую» и «таджикскую» аллели *LukX* отличает друг от друга меньшее количество нуклеотидных замен, чем «европейскую» и «афганскую»". Однако, данное высказывание справедливо лишь в отношении первого экзона, тогда как остальные 11 экзонов не были исследованы. То же относится к утверждению о независимом происхождении "таджикской" и «афганской» аллели. Полученные данные не позволяют исключить возможность эволюционного родства "афганских" и "таджикских" аллелей за счет изменений в других частях молекулы, например, трансмембранного домена.

3. Считаю неудачной формулировку "Аллельные состояния, выявленные для *LukX*, четко коррелируют с проявлением признака повышенной избирательности к ризобиям и приводят к аминокислотным заменам в функциональном домене кодируемого белка." Во-первых, выражение "в функциональном домене" выглядит странно, как если бы все остальные домены не были функциональны. Во-вторых, "четко коррелирует" здесь не вполне уместно. У всех изученных образцов, имеющих "афганский" фенотип, действительно были зарегистрированы замены в гене *LukX*, однако не всякая замена в *LukX* приводит к возникновению повышенной избирательности к микросимбионту. "Афганский" аллель отличается от "европейского" тремя аминокислотными заменами в рецепторном домене белка *LukX*, и непонятно, будет ли иметь эффект на фенотип каждая отдельно взятая замена.

4. Недостаточно понятно описан растительный материал, использованный для TILLING-анализа. Автор пишет: "В работе была использована коллекция EMS-мутантов гороха", при этом не вполне понятно, что за материал был исследован – M1, M2, растения, семена или ДНК.

5. Несколько неудобно читать таблицы, поскольку обозначения в заголовках столбцов не всегда понятны, а пояснения даны внизу таблицы, и приходится их долго искать, особенно в случае больших таблиц в приложении.

Заключение.

Высказанные замечания не носят принципиального характера и не умаляют достоинства настоящей работы, в которой автор последовательно выдвигает аргументы в пользу защищаемых им положений.

Представленная работа вносит существенный вклад в развитие генетики бобово-ризобиального симбиоза и соответствует критериям, установленным пп. 9-14 "Положения о присуждении ученых степеней" от 24.09.2013 №842, а ее автор заслуживает присвоения степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Доктор биологических наук (специальность 03.02.07 – генетика)
Богданова Вера Сергеевна
старший научный сотрудник лаборатории
генетики и эволюции бобовых растений
ФГБУН ФИЦ Институт цитологии и генетики
Сибирского Отделения РАН
630090 Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10
тел. (383) 363 49 36*1202
+7-913-893-46-59
e-mail: vera@bionet.nsc.ru

31 августа 2020 г.

*Ученый секретарь ИГиТ СО РАН, е.д.н.
Орлова Вера Сергеевна*