

«УТВЕРЖДАЮ»

Профессор по научной работе СПбГУ



С. В. Микушев

12 марта 20 10 г.

## ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Сулимы Антона Сергеевича на тему  
«ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНА *ЛУКХ*, ОПРЕДЕЛЯЮЩЕГО СПЕЦИФИЧНОСТЬ  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.) С КЛУБЕНЬКОВЫМИ  
БАКТЕРИЯМИ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*»  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности: 03.02.07 – генетика

Диссертация Сулимы Антона Сергеевича посвящена изучению молекулярной природы гена *ЛукХ* гороха, отвечающего за специфичность взаимодействий растения с симбиотическими азотфиксирующими бактериями *Rhizobium leguminosarum*

### **Актуальность избранной темы.**

В настоящее время симбиогенетика, как наука, развивается очень бурно. Изучение генетических основ взаимодействия организмов в экосистемах в настоящее время проводят самыми современными методами, что уже привело к накоплению большого пула новых данных, четко указывающих на то, что многие признаки растений в значительной степени определяются не только их собственным генотипом, но и генотипами их симбионтов. Исходя из этого, выявление конкретных генетических механизмов, контролирующих формирование симбиоза, является актуальной задачей, особенно если объектом исследования выбрано растение, представляющее собой не только классический генетический объект, но и ценную сельскохозяйственную культуру. «Афганский» фенотип гороха с узкой симбиотической специфичностью известен многие десятилетия. Однако, до последнего момента оставались загадкой его молекулярно-генетические основы. В представленной работе раскрыта молекулярная природа гена и описаны его аллельные состояния, отвечающие за различные варианты реализации признака.

### **Связь работы с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства.**

Проблема изучения симбиотической азотфиксации напрямую связана в современном сельском хозяйстве с отказом от применения большого количества азотных удобрений и переходу к щадящему адаптивному земледелию, предполагающему максимальное использование биологического потенциала почв с сохранением и даже повышением их плодородия. Понимание механизмов выбора партнеров в бобово-ризобиальном симбиозе позволит правильно подбирать сорта растений и микробные препараты для их наилучшего роста и продуктивности. Данное направление исследований лежит в русле Приоритетов НТР, в частности «Переход к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, разработка и внедрение систем рационального применения средств химической и биологической защиты сельскохозяйственных растений и животных, хранение и эффективную переработку сельскохозяйственной продукции, создание безопасных и качественных, в том числе функциональных, продуктов питания».

### **Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

В работе впервые идентифицированы образцы гороха посевного, являющиеся носителями «афганской» аллели гена *Sym2*, обнаружен новый уникальный для гороха ген (*LykX*), кодирующий рецепторную киназу из семейства LysM-RLK, полностью определена его нуклеотидная последовательность и интрон-экзонная структура, изучены аллельные состояния. Продемонстрировано, что два независимых аллельных состояния гена коррелируют с проявлением «афганского» (узкоспецифичного) фенотипа и отличаются от аллелей «европейского фенотипа», являющихся не менее древними, чем аллели узкой специфичности. На основе изучения фенотипа мутантов по гену *LykX*; сделан вывод о важности последнего для успешного проникновения бактерий в клетки корневых волосков гороха. На основе теста на аллелизм мутаций *lykX* и природных аллелей *Sym2*, коррелирующих с широкой и узкой специфичностью симбиоза, подтверждена гипотеза о тождественности генов *LykX* и *Sym2*.

### **Практическая значимость полученных результатов.**

Понимание молекулярно-генетических основ специфичности бобово-ризобиального симбиоза чрезвычайно важно для создания эффективных комбинаций симбионтов, осуществляющих процесс биологической азотфиксации, в частности новых сортов гороха с известной избирательностью по отношению к ризобиям. Создание молекулярного маркера на основе информации о SNP в гене *LykX* (*Sym2*) будет способствовать более успешной селекции по данному признаку.

### **Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.**

Положения, сформулированные в диссертации, основаны на большом объеме фактического материала, выводы полностью обоснованы совокупностью приведенных данных, выбор методов исследования и статистическая обработка экспериментальных данных адекватны поставленным задачам, достоверность результатов не вызывает сомнений.

### **Оценка содержания диссертации, ее завершенности.**

Диссертация Сулимы Антона Сергеевича построена по традиционному плану и содержит список сокращений, введение, четыре главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение), заключение, выводы, список литературы из 233 источников, приложения.

В обзоре литературы автор освещает вопросы, касающиеся разнообразия растительно-микробных симбиозов, их роли в эволюции растений, подробно останавливается на симбиозе растений с клубеньковыми бактериями, описывает стадии развития азотфиксирующего клубенька и основные растительные гены, вовлеченные в контроль этого процесса. Завершает главу раздел о горохе, как объекте исследования, а также о его «афганском» фенотипе, что является плавным переходом к собственно исследованию. Обзор написан хорошим языком, с интересом читается.

В главе «Материалы и методы» достаточно подробно описаны использованные линии гороха, штаммы бактерий, а также методы исследования. Широта использованных методов (от классического генетического анализа до анализа результатов NGS) является залогом надежных результатов, полученных в данной работе.

В главе «Результаты» автор знакомит читателя с новыми выявленными им линиями гороха, проявляющими «афганский» фенотип, далее приводит результаты, свидетельствующие об открытии нового гена *LykX*, продукт которого участвует в рецепции Nod-фактора, приводит данные о его нуклеотидной последовательности, интрон-экзонной структуре, вариабельности первого экзона, коррелирующей с проявлением специфичности симбиоза. Далее была предпринята

попытка поиска новых аллелей изучаемого гена методом TILLING, логичным завершением работы стал тест на аллелизм индуцированной мутации в гене *LycX* и природных аллелей гена *Sym2*, результаты которого не противоречат гипотезе о тождественности *Sym2* и *LycX*.

В главе «Обсуждение» Антон Сергеевич приводит гипотетическую схему распознавания структуры Nod-фактора рецепторными киназами гороха и еще раз подводит читателя к мысли о тождественности *Sym2* и *LycX*.

### **Замечания к работе.**

Не смотря на общее очень благоприятное впечатление о работе, в ней есть некоторые недочеты и неясности.

1. В работе встречаются неудачные слова и выражения. Так, уже в списке сокращений читаем «кДНК – кодирующая ДНК», в то время, как принято считать, что кДНК – это комплементарная ДНК, получаемая в ходе обратной транскрипции.

По тексту работы неоднократно встречается просторечный вариант множественного числа слова «горох» - «горохи». Следовало бы вместо этого написать – линии гороха (или сорта, генотипы, формы...)

В главе «Материалы и методы» постоянно встречаются возвратные формы глаголов.

2. Вызывает вопросы нумерация разделов в обзоре литературы. Например, после раздела 1.1.1 сразу идет раздел 1.2; после раздела 1.3.1. сразу идет раздел 1.4. Этими примерами дело, к сожалению, не ограничивается.
3. По сути тоже есть вопросы. Так, в работе описана молекулярная природа таджикской и афганской аллелей, определяющих узкую специфичность симбиоза. Нуклеотидные замены приводят к разным заменам аминокислот. Было бы очень уместно построить компьютерные модели всех трех вариантов белков («афганского, таджикского, европейского»), постараться найти общие черты у «афганского» и «таджикского» вариантов.
4. На стр. 79 автор называет афганскую аллель более древней. Не совсем ясно, по отношению к какой аллели? Можно ли делать этот вывод только базируясь на количестве замен в кодирующей последовательности? Автор сам же приводит данные о некодирующих последовательностях в непосредственной близости к изучаемому гену. Эта область сильнее отличается у таджикской формы. А если принять во внимание географический критерий (центрами происхождения гороха считают Средиземноморский и Переднеазиатский), а также аллельное состояние гена у диких родственников гороха посевного, то напрашивается вывод о том, что древнее всех европейская аллель. Надо сказать, что далее в работе автор тоже склоняется в эту сторону.
5. В работе получены очень интересные фактические данные, но в обсуждении имеет место излишняя осторожность и недосказанность. Нет никаких мыслей о том, каков биологический смысл узкоспецифичных аллелей. Хотелось бы услышать мысли Антона Сергеевича на эту тему.

Высказанные вопросы не снижают значимости данной работы, а многие замечания носят дискуссионный характер. Результаты этой работы будут использованы во многих научных и образовательных организациях в нашей стране и за ее пределами.

### **Соответствие автореферата основным положениям диссертации.**

Автореферат диссертации оформлен по классической схеме, соответствует установленным требованиям. Материалы, представленные в автореферате, точно отражают основные результаты проведенных исследований, создают четкое представление о содержании диссертации и степени участия автора в исследованиях.

## **Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати**

Основные результаты диссертации опубликованы в виде трех статей в журналах, индексируемых WOS и Scopus, а также пяти тезисов докладов международных конференций.

### **Заключение**

Таким образом, диссертация Сулимы Антона Сергеевича на тему «ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНА *LYKX*, ОПРЕДЕЛЯЮЩЕГО СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.) С КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной задачи – изучение молекулярной природы аллельных вариантов гена *LukX* (*Sym2*), коррелирующих с широкой и узкой специфичностью бобово-ризобиального симбиоза, что имеет существенное значение для развития симбиогенетики. По теоретической и практической значимости результатов проведенного исследования, актуальности выбранной темы, научной новизне, достоверности и обоснованности научных результатов, диссертационная работа Сулимы Антона Сергеевича полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства РФ от 01.10.2013 г. № 842 (с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ от 01.10.2018 г. № 1168), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.02.07 – генетика

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на заседании кафедры генетики и биотехнологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» (25.03.2020, Протокол № 52).

Профессор кафедры генетики и биотехнологии  
Федерального государственного бюджетного  
Образовательного учреждения высшего образования  
«Санкт-Петербургский государственный университет»  
Доктор биологических наук (03.02.07 – генетика)



Матвеева Татьяна  
Валерьевна

199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, Федеральное государственное бюджетное Образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», тел. +7(812) 36 36 105 e-mail: [spbu@spbu.ru](mailto:spbu@spbu.ru)  
<https://bio.spbu.ru/faculty/departments/genetics/>