

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Пермский федеральный
исследовательский центр
Уральского отделения
Российской академии наук
(ПФИЦ УрО РАН)
филиал

«Институт экологии и генетики
микроорганизмов
Уральского отделения
Российской академии наук»
(«ИЭГМ УрО РАН»)

614081, Пермский край, г. Пермь, ул. Голева, д.13

Тел.: (342) 280-74-42, факс: 280-92-11

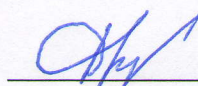
www.iegm.ru, e-mail: info@iegm.ru

ОКПО 15731815, ОГРН 1025900517378

ИНН 5902292103, КПП 590343001

УТВЕРЖДАЮ

Директор «Института экологии и генетики
микроорганизмов Уральского отделения
Российской академии наук» – филиала
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Пермского федерального
исследовательского центра Уральского
отделения Российской академии наук
чл.-корр. РАН



В.А. Демаков

«14» 24.01.2019



от 14.01.2019 № 17700-ИЭ/2171-09

на № _____ от _____

ОТЗЫВ

ведущей организации

о научно-практической ценности диссертации

ЕКИМОВОЙ Галины Александровны «Филогенетическая и биохимическая характеристика 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминаз и D-цистеиндесульфогидраз у представителей рода *Methylobacterium*», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности: 03.02.03 – «Микробиология»

Актуальность избранной темы

Среди аэробных метилотрофных бактерий, использующих метанол, метиламин и другие окисленные и замещённые производные метана в качестве источников углерода и энергии, многие представители симбиотически связаны с растениями, колонизируя листовую поверхность, ризосферу, внутренние ткани и семена. Тесная связь растений и метилотрофов объясняется тем, что первые являются глобальным источником метанола и других C₁ соединений, которые потребляют метилотрофные бактерии, в свою очередь

синтезируя фитогормоны, витамины, осмопротекторы, повышая устойчивость к фитопатогенам, а также фиксируя молекулярный азот. Среди широкого спектра биологически активных соединений особую роль в фитосимбиозе занимает 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота (АЦК) – предшественник в биосинтезе этилена растениями. Этилен – один из основных фитогормонов, он играет важную роль в развитии корневой системы, созревании плодов, а также в передаче стрессового сигнала. Как часть стрессовой реакции он ингибирует удлинение корня, нодуляцию и транспорт ауксинов, ускоряет старение тканей и вызывает дефолиацию. Бактерии, обладающие ферментом АЦК-дезаминазой, который деградирует АЦК до неактивных α -кетобутирата и ионов аммония, способствует снижению концентрации этилена и повышению устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам. Помимо этого, у растений и ряда бактерий обнаружен фермент, отличающийся высоким уровнем сходства аминокислотной последовательности с АЦК-дезаминазой – D-цистеиндесульфогидраза, который катализирует деградацию D-цистеина до пирувата, сероводорода и аммиака. Активность этого фермента определяет устойчивость бактерий к токсичному для них D-цистеину, а выделяющийся при его деградации сероводород обладает фунгицидными свойствами и по последним данным регулирует множество физиологических процессов у растений. Предполагается, что по этим причинам D-цистеиндесульфогидраза также принимает участие в формировании ассоциаций бактерий с растениями.

Проблема расшифровки биохимических путей синтеза фитогормонов не только растениями, но и их симбионтами весьма актуальна, как с точки зрения фундаментальной науки, так и в прикладном аспекте. В связи с этим новые знания, полученные в ходе выполнения данной работы являются чрезвычайно важными, расширяя и углубляя понимание механизмов симбиоза микробов с растениями, что способствует реализации их биотехнологического потенциала в сфере разработки новых биопрепаратов-стимуляторов роста и развития растений, повышающих продуктивность и устойчивость растений к стрессовым воздействиям и фитопатогенам.

Связь работы с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационное исследование Екимовой Г.А. выполнено на базе Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН) в рамках учебной программы аспирантуры 03.02.03 «Микробиология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Пушкинский государственный естественно-научный

институт (ПушГЕНИ) в соответствии с планом НИР данного учреждения. Новизна и актуальность работы косвенно подтверждается тем, что фрагменты работы поддержаны грантами: РФФИ №№ 12-04-31373-мол_а, 14-04-32202-мол_а, 16-04-00381-а, 18-34-00998 мол_а, РФФИ №14-14-01045, ГЗ №6.749.2014/к.

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

Научная новизна диссертационной работы состоит в том, что впервые для метилотрофов получены делеционные мутанты эпифитной метилотрофной бактерии *M. radiotolerans* по структурному (*acdS*) и регуляторному (*acdR*) генам АЦК-дезаминазы, а также их комплементированные варианты, проанализирована их способность к деградации АЦК. Диссертантом, впервые для альфапротеобактерий, удалось клонировать и очистить регуляторный белок AcdR, относящийся в Lrp-семейству, а также показать его роль в регуляции АЦК-дезаминазы у *M. radiotolerans*.

Галине Александровне удалось установить наличие генов ферментов катаболизма растительных аминокислот – 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты и D-цистеина – АЦК-дезаминазы и D-цистеиндесульфогидразы у метилотрофов различного таксономического положения, а также провести филогенетический анализ транслированных аминокислотных последовательностей этих генов. Были клонированы гены и охарактеризованы рекомбинантные АЦК-дезаминазы из *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и факультативно метилотрофной актинобактерии *Amycolatopsis methanolica* 239.

Представленные материалы молекулярно-биохимических исследований свидетельствуют, что АЦК-дезаминазы бактерий играют одну из ключевых ролей в фитосимбиотических взаимоотношениях, повышая устойчивость к биотическим стрессам, а также стимулируя рост и развитие. Автор диссертации выдвинул предположение о том, что наличие АЦК-дезаминаз является одним из адаптационных механизмов ассоциации бактерий с растениями и ее активность обусловлена экологической нишей, занимаемой бактерией, что может быть подтверждено уровнем активности АЦК-дезаминазы у метилотрофных бактерий состоящих в фитосимбиотических отношениях разной степени близости.

Таким образом, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования данные обеспечили новизну сформулированных выводов.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций

Диссертантом получены ценные для микробиологии, биохимии и биотехнологии материалы, имеющие фундаментальное и прикладное значение.

С теоретической точки зрения, проведённые в рамках диссертационной работы исследования биохимических свойств, распространения и транскрипционной регуляции АЦК-дезаминаз у аэробных метилотрофных бактерий позволяют расширить представления о молекулярно-биохимических механизмах организации и регуляции симбиоза микробов с растениями. Разработанные системы вырожденных олигонуклеотидных праймеров для детекции и амплификации генов АЦК-дезаминаз (*acdS*) и D-цистеиндесульфогидраз (*dcyD*) позволят исследователям в дальнейшем оценивать способность бактерий к деградации растительных аминокислот.

Прикладным аспектом работы является применение полученных новых знаний в биотехнологии и сельском хозяйстве. Утверждается, что наличие гена АЦК-дезаминазы характерно для бактерий, ассоциированных с растениями, поскольку АЦК доказано только для растений. Также автор указывает на роль бактериальных D-цистеиндесульфогидраз (ферментов, отличающихся высоким уровнем сходства аминокислотной последовательности с АЦК-дезаминазой) в растительно-микробных ассоциациях. Катализируемая этими ферментами реакция является источником сероводорода. В последнее десятилетие во многих работах показана значительная роль сероводорода в стимуляции роста и развития, а также его участие в защите растений от различных видов стрессов, поэтому D-цистеиндесульфогидраза, вероятно также принимает участие в формировании ассоциаций бактерий с растениями. Таким образом, результаты диссертационного исследования позволят лучше реализовать биотехнологический потенциал аэробных микробов, разработать новые биопрепараты-стимуляторы роста и развития растений с заданными свойствами, повышающие продуктивность и устойчивость растений к стрессовым воздействиям и фитопатогенам.

Обоснование и достоверность научных положений, выводов и заключений

Цель корректно сформулирована, из неё вытекают поставленные задачи. Сделанные в результате проведённого исследования выводы подкрепляют положения диссертации, выдвинутые на защиту.

Уровень анализа научных работ отечественных и зарубежных исследователей, отражает состояние проблемы изучения симбиотических взаимоотношений аэробных микробных бактерий и растений, что подчёркивает теоретическую подготовку автора.

В рецензируемой работе представлены результаты лабораторных исследований биохимических свойств и транскрипционной регуляции АЦК-дезаминаз и D-цистеиндесульфогидраз у аэробных микробных бактерий. Объективность

полученных материалов подтверждается использованием адекватных методов статистического анализа при помощи SigmaPlot 10.0.

Исходя из этого, можно заключить, что сформулированные в диссертации научные положения, выводы и заключение являются обоснованными и достоверными.

Оценка содержания диссертации, её завершенность в целом, замечания по оформлению

Диссертация Екимовой Галины Александровны является завершенной научно-квалификационной работой, написанной в традиционном стиле, хорошим языком, читается легко. Диссертация, изложенная на 107 страницах, включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, экспериментальную часть, заключение, выводы. Список цитируемой литературы содержит 226 источников, в том числе 25 на русском и 201 на английском языках. Работа иллюстрирована 8 таблицами и 38 рисунками. Диссертационная работа обладает внутренним единством. Использованные методические подходы направлены на решение поставленной цели и конкретных задач исследования.

При изучении текста диссертации возникли вопросы:

1. Чем объяснить тот факт, что Вам не удалось, используя сконструированные праймеры, обнаружить гены АЦК-дезаминаз у исследованных Вами β - и γ -протеобактерий (в отличие от α -протеобактерий) учитывая, что среди привлечённых к исследованию видов β - и γ -*Proteobacteria* были представители, впервые выделенные из микробо-растительных ассоциаций?
2. Проводился ли поиск гена D-цистеиндесульфогидразы с сконструированными Вами праймерами (кроме α протеобактерий) среди представителей других классов *Proteobacteria*?
3. Какое конкретное практическое применение могут иметь результаты Вашего исследования, планируются ли эксперименты по воздействию исследованных штаммов метиловобактерий на сельскохозяйственные растения?

Данные вопросы носят уточняющий характер и не умаляют достоинств работы.

С учётом вышеизложенного, диссертационная работа Екимовой Г.А. может быть оценена положительно.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Текст автореферата соответствует основным положениям и выводам, изложенным в диссертации. Указан вклад автора в проведённое исследование, отражена новизна, практическая значимость результатов, приведён список публикаций, в которых отражены

основные научные результаты исследования. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационной работы.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Соискателем по теме диссертации опубликовано 14 научных работ, из которых 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК (две из них – статьи в иностранной печати), а также 11 тезисов. Материалы диссертации доложены и широко обсуждены на Всероссийских и международных конференциях.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения учёных степеней

Таким образом, диссертация Екимовой Галины Александровны на тему: «Филогенетическая и биохимическая характеристика 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминаз и D-цистеиндесульфогидраз у представителей рода *Methylobacterium*» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи изучения распространения генов АЦК-дезаминаз и D-цистеиндесульфогидраз, биохимических свойств, а также транскрипционной регуляции экспрессии генов этих ферментов у аэробных метилотрофных бактерий, имеющей существенное значение для микробиологии, биохимии и биотехнологии, что соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842. Автор заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Отзыв обсуждён и одобрен на расширенном заседании Лаборатории водной микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института экологии и генетики микроорганизмов» Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН) 11 января 2019 года (Протокол № 1 от 11.01.2019 г.).

Заведующий лабораторией водной микробиологии «ИЭГМ УрО РАН», д.б.н., профессор

Саралов А.И.

Подпись д.б.н., проф. Саралова А.И. заверяю, Начальник отдела кадров



Корепанова М.В.

14.01.2019 г.

614081 г. Пермь, ул. Голева, д. 13. «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук. Тел. (342) 280 83 32. Факс: (342) 280 92 11. E-mail saralov@iegm.ru. Internet: www.iegm.ru