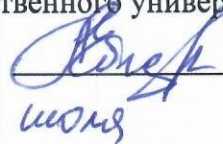


«УТВЕРЖДАЮ»

И. о. проректора по научной работе
Санкт-Петербургского
государственного университета




Е. В. Лебедева
«10» июля 2024 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Шкрыля Юрия Николаевича на тему
«АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ГЕНЫ *rol* КАК АКТИВАТОРЫ БИОСИНТЕЗА
ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ И СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ»
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности: 1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

Диссертация Шкрыля Юрия Николаевича посвящена изучению механизмов регуляции *rol*-генами агробактерий вторичного метаболизма и некоторых других процессов, связанных со стрессоустойчивостью. (В данном отзыве термин «агробактерии» будет использован в широком смысле слова).

Актуальность избранной темы.

Культуры косматых корней, индуцированные *Rhizobium rhizogenes* (Riker et al. 1930) Young et al. 2001, описаны давно. Известно, что данный симптом развивается в результате экспрессии перенесенных от бактерии генов, главную роль среди которых играют *rol*-гены. Буквально с середины 80-х годов прошлого века стало понятно, что функция *rol*-генов связана и с регуляцией специализированного (вторичного) метаболизма. Однако, использование *rol* генов в биотехнологии тормозится из-за недостаточного понимания молекулярных механизмов их действия. Во многих случаях гены *rol* стимулируют синтез специализированных метаболитов различной природы, но иногда они могут оказывать ингибирующее воздействие на процессы вторичного метаболизма, что подчеркивает необходимость проведения дополнительных исследований, направленных на изучение механизмов их влияния на биосинтетические пути растительных клеток, чему и посвящена представленная работа.

Материалом для исследования эффектов, индуцируемых генами *rol*, послужили каллусные культуры двух видов растений: ценного лекарственного растения - марены сердцелистной (*Rubia cordifolia* L.) и модельного объекта генетики растений -

резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana* L.), а также корневые культуры лекарственного растения *Aristolochia manshuriensis* Kom. и трансгенные растения *A. thaliana*.

Новизна исследования и практическая значимость полученных результатов.

В диссертационной работе показано, что гены *rolA* и *rolB* способны длительное время поддерживать высокий уровень биосинтеза антрахинонов в трансгенных клеточных культурах *R. cordifolia* за счет активации экспрессии ключевых генов их биосинтеза - изохоризмат-синтазы (*ICS*), О-сукцинилбензоат-КоЛ-синтазы (*OSBS*) и О-сукципилбензоат-КоА-лигазы (*OSBL*) и изопентенилдифосфат-дельта-изомеразы (*IPPi*). При этом эффект *rolB* постоянен, а ген *rolA* вызывает постепенное повышение уровня продукции антрахинонов в процессе культивирования.

Впервые продемонстрирована способность генов *rol*, ингибировать образование внутриклеточных активных форм кислорода, приводя к устойчивости трансгенных клеток к неблагоприятным факторам. Установлено, что механизмы регуляции АФК посредством *RoIB* и *RoIC* различаются.

Разработан эффективный способ активации вторичного метаболизма клеток марены сердцелистной посредством генетической трансформации генами *rol*. Установлено, что при использовании данного подхода максимальная продуктивность антрахинонов составила 874 мг/л.

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 Шкрыля Юрия Николаевича построена по традиционному плану и содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список литературы, содержащий 802 источника. Диссертация изложена на 353 страницах и содержит 61 рисунок и 17 таблиц.

В обзоре литературы автор освещает вопросы, касающиеся механизмов агробактериальной трансформации, основных функций генов Т-ДНК *R. rhizogenes*, сигнальных систем растений, роли АФК в сигналинге, разнообразия специализированных метаболитов *Rubia cordifolia*, *Arabidopsis thaliana* L, *Aristolochia manshuriensis*.

В главе «Материалы и методы» достаточно подробно описаны использованные клеточные культуры, штаммы бактерий, а также методы исследования. Широта использованных методов (биохимических, биотехнологических, молекулярно-генетических) является залогом надежных результатов, полученных в данной работе.

В главе «Результаты и обсуждение» Юрий Николаевич приводит полученные данные о повышенном содержании антрахинонов в культурах клеток *Rubia cordifolia*, экспрессирующих гены *rolA* и *rolB*, демонстрирует противовоспалительные и антиоксидантные свойства экстрактов на экспериментальных моделях *in vivo*. Автор демонстрирует, что в каллусной культуре *Arabidopsis thaliana* вторичный метаболизм подавлен, а трансформация геном *rolB* приводит к повышению концентрации индольных глюкозинолатов, флавоноидов.

В работе четко продемонстрировано, что гены *rolB* и *rolC* вызывают дозо-зависимое снижение концентрации внутриклеточных АФК за счет разных механизмов (*rolB* активирует экспрессию как прооксидантных, так и антиоксидантных генов, а *rolC* не затрагивает антиоксидантную систему), что в свою очередь приводит к повышенной устойчивости клеток к засолению и экстремальным температурам. Очень интересный результат касается влияния *rolB* на механизмы регуляции посредством микро-РНК. Полученный результат требует продолжения исследований в данном направлении. Учитывая все сказанное выше, гены *rol* представляют собой эффективный инструмент в биотехнологии растений для создания стабильных клеточных культур с повышенным содержанием вторичных метаболитов, а также перспективны как инструмент усиления стрессоустойчивости растений.

Замечания к работе.

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

Замечания по сути работы.

1. Из литературы известно, что уровень содержания вторичных метаболитов в каллусных культурах обычно ниже, чем в дифференцированных клетках. Аналогичную тенденцию наблюдали авторы в случае арабидопсиса. Соответственно при оценке влияния генов *rol* на биосинтез вторичных метаболитов в трансформированных корнях *Aristolochia munshuriensis* контролем лучше считать нормальные корни, а не каллус.
2. Представляется спорным высказывание на стр. 93: «Принимая во внимание естественную историю взаимодействий агробактерий с растениями, в которой гены T-ДНК участвовали в инфекционных процессах и играли роль на ранних этапах эволюции

(Aoki and Syono 1999; Intriери and Buiatti, 2001), можно предположить, что *rolC* влияет на более древние регуляторные механизмы растений “выше по течению” и не затрагивает пути передачи сигналов АФК и защитных гормонов”. Отталкиваясь от наших знаний о взаимодействии агробактерий и двудольных растений, можно предполагать, что этот симбиоз не настолько древний, как регуляторные механизмы, посредством АФК или фитогормонов. О древних механизмах можно рассуждать, отталкиваясь от способности агробактерий трансформировать как грибы, так и растения, а также от примеров природных ГМО, сохранивших *plast-гены* в геномах как у растений, так и у грибов. Но в этом случае речь не идет конкретно о *rolC*.

3. На странице 260 представлена схема функционирования генов *rol*. Учитывая содержание работы, представляется не совсем логичным располагать микро-РНК как нечто обособленное сбоку от остальных участников процесса.

Замечания по структуре работы

В обзоре литературы присутствует несколько глав, которые выглядят совершенно разрозненно, без логических связей. Только прочтя всю работу, или будучи знакомым с исследованиями коллектива под руководством Ю.Н. Шкрыля, можно понять, почему в обзоре даны сведения на столь разные темы. Не хватает содержательных связей между главами и общего заключения к обзору.

Замечания редакторского характера.

1. В тексте встречаются названия растений, характерные для разговорного стиля речи: хлопок, помидор и т.п., имеются несогласованные предложения.

2. Начиная со стр. 8 введения Т-ДНК расшифровывается как транспортная. Это не совсем корректно. Она ничего не транспортирует, а сама переносится в клетку реципиента.

3. Не совсем удачной является формулировка “белки не обладают выраженной гомологией” и подобные ей в различных частях текста диссертации. Гомология - это сходство, основанное на общем происхождении. Корректнее было бы написать; “Последовательности не обладают высоким уровнем (или степенью) сходства”.

Утверждение на стр. 9 “Долгое время считалось, что исключительной функцией генов *rol* является воздействие на гормональный статус трансформированных клеток”, не корректна. Уже в середине 80-х годов культуры косматых корней использовали для получения вторичных метаболитов (см Мапо Y, et al., (1986) Production of Tropane Alkaloids by Hairy Root Cultures of *Scopolia japonica*, Agricultural and Biological Chemistry, 50:1 1, 2715-2722, DOI:10.1080/00021369.1986.10867820)

4. В обзоре литературы рекомендуется использовать полные латинские названия, включая авторство, при первом упоминании организма. Это особенно важно для таксонов, чье таксономическое положение еще не устоялось, например агробактерии. *Rhizobium radiobacter* не является современным наименованием *Agrobacterium tumefaciens*.
5. На стр. 22 неудачное выражение - “опухолеобразующие гены”, на стр. 30- “дикий штамм”. Лучше сказать - штамм дикого типа или природный изолят (в зависимости от того, что имеется в виду).
6. Ген *rolB* не на всех плаزمиде присутствует в двух копиях, как утверждает автор на стр. 30.
7. Не корректна формулировка “молекулярная масса белка RolB, выделенного из штамма A4”. Белок закодирован в плазмиде этого штамма, а выделен мог быть только из растительных клеток. Про изучение внутриклеточной локализацию белка написано так, что можно подумать, будто он находится в бактериальной клетке. При описании структуры белка упоминается, что он содержит мотив CX5R, характерный для тирозин-фосфатаз. однако не сказано, что данный мотив есть не у всех RolB. Это важно, поскольку могло бы объяснить противоречивые данные о внутриклеточной локализации, полученные на разном материале (стр. 31-33).
8. На стр. 36 сказано, что к настоящему моменту известно более 23 представителей природных ГМО. Лучше было бы точнее написать, к какому году относится эта цифра. Сейчас известно гораздо больше родов, содержащих природные ГМО.
9. На стр. 36 указан странный вид - львиный зев *Lunaria vulgaris*. Должно было быть - льнянка обыкновенная *Linaria vulgaris* Mill.
10. При описании природных ГМО в пределах рода *Nicotiana* лучше опираться на более надежные данные, основанные на результатах анализа NGS, а не работу Intrieri, результаты которой можно воспроизвести лишь частично.
11. Не понятен смысл предложения на стр. 60: «Более того, совместно с AIRbohA-AtRbohC, AtRbohG и AtRbohI они создают вертикальную ось распространения волны окислительного взрыва от одной верхушки побега к другой»
12. Не удачно выражена мысль на стр. 44: “Многие процессы предполагают формирование специфичных осцилляций, включая рост и развитие...” В отрыве от текста на предыдущей странице можно понять не так, как предполагал автор.
13. На стр. 78 не корректно написаны названия ферментов “калхонсинтаза, калхонизомераза, калхонредуктаза”, верный вариант должен начинаться с “халкои-”
14. Поколения трансгенных растений обозначают T1, 2, 3, а не F1, 2, 3, как написано на

стр 157.

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.

Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Основные результаты диссертации опубликованы в виде 17 статей в журналах, рекомендованных ВАК, а также представлены на многочисленных докладах на международных конференциях.

Заключение

Таким образом, диссертация Шкрыля Юрия Николаевича на тему «АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ГЕНЫ *rol* КАК АКТИВАТОРЫ БИОСИНТЕЗА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ И СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной задачи - изучение роли *rol*-генов для создания стабильных клеточных культур с повышенным содержанием вторичных метаболитов, а также и усиления стрессоустойчивости растений. По теоретической и практической значимости результатов проведенного исследования, актуальности выбранной темы, научной новизне, достоверности и обоснованности научных результатов, диссертационная работа Шкрыля Юрия Николаевича полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства РФ от 01.10. 2013 г. № 842 (в действующей редакции), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности: 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).

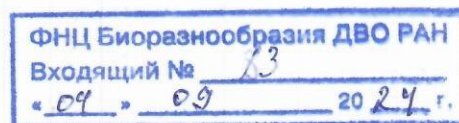
Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на заседании кафедры генетики и биотехнологии

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (Протокол №8 от 27.06.2024).

Доктор биологических наук по специальности
03.02.07 - Генетика, доцент,
Профессор кафедры генетики и биотехнологии
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный университет»

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
<https://bio.spbu.ru/faculty/departments/genetics/>



Сведения о ведущей организации

по докторской диссертации Шкрыля Ю.Н. «Агробактериальные гены *rol* как активаторы биосинтеза вторичных метаболитов и стрессоустойчивости клеток растений» по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербургский университет или СПбГУ
Ведомственная принадлежность	Правительство Российской Федерации
Почтовый индекс, адрес организации	199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д.7/9
Адрес официального сайта в сети «Интернет»	www.spbu.ru
Телефон	+7 (812) 328-97-01
Адрес электронной почты	spbu@spbu.ru
Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет	<ol style="list-style-type: none"> 1. Khafizova, G.V.; Sierro, N.; Ivanov, N.V.; Sokornova, S.V.; Polev, D.E.; Matveeva, T.V. <i>Nicotiana noctiflora</i> Hook. Genome Contains Two Cellular TDNAs with Functional Genes. <i>Plants</i> 2023, 12, 3787. https://doi.org/10.3390/plants12223787 2. Zhidkin, R.; Zhurbenko, P.; Bogomaz, O.; Gorodilova, E.; Katsapov, I.; Antropov, D.; Matveeva, T. Biodiversity of <i>rolB/C</i>-like Natural Transgene in the Genus <i>Vaccinium</i> L. and Its Application for Phylogenetic Studies. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 2023, 24, 6932. https://doi.org/10.3390/ijms24086932 3. Matveeva T, Andronov E, Chen K. Editorial: Rhizobiaceae mediated HGT: Facts, mechanisms, and evolutionary consequences. <i>Front Plant Sci.</i> 2023 Feb 1;14:1149426. doi: 10.3389/fpls.2023.1149426. 4. Chen K, Zhurbenko P, Danilov L, Matveeva T, Otten L. Conservation of an <i>Agrobacterium</i> cT-DNA insert in <i>Camellia</i> section <i>Thea</i> reveals the ancient origin of tea plants from a genetically modified ancestor. <i>Front Plant Sci.</i> 2022 Dec 6;13:997762. doi: 10.3389/fpls.2022.997762. PMID: 36561442; PMCID: PMC9763466. 5. Matveeva T, Otten L. Opine biosynthesis in naturally transgenic plants: Genes and products. <i>Phytochemistry.</i> 2021, 189:112813. doi: 10.1016/j.phytochem.2021.112813. 6. Sokornova SV, Matveeva TV. Iridoid glycosides of the tribe Antirrhineae. <i>Phytochemistry Reviews.</i> 2021. doi.org:10.1007/s11101-021-09774-0. 7. Sokornova S.V., Matveeva T.V. Phylogenetic Relationships of Ascomycetes Opine Synthases In: Selected abstracts of Bioinformatics: from Algorithms to Applications 2021 Conference. <i>BMC Bioinformatics</i> 22, 591 (2021). https://doi.org/10.1186/s12859-021-04475-z

	<p>8. Matveeva, T.V. & Otten, L. Widespread occurrence of natural genetic transformation of plants by Agrobacterium Plant Mol Biol (2019) 101: 415. https://doi.org/10.1007/s11103-019-00913-y</p> <p>9. Matveeva T.V., Provorov N.A., Valkonen Ja. Cooperative adaptations and evolution in plant-microbe systems, Frontiers in Plant Science, 2018, V. 9, https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01090</p> <p>10. Matveeva T.V. Agrobacterium-mediated transformation in the evolution of plants. Curr Top Microbiol Immunol. 2018;418:421-441. doi: 10.1007/82_2018_80.</p> <p>11. Khafizova, G., Dobrynin, P., Polev, D., Matveeva, T Nicotiana glauca wholegenome investigation for cT-DNA study BMC Research Notes, 2018, 11(1): 18. doi: 10.1186/s13104-018-3127-xWoS. Scopus. IF 1.4</p> <p>12. Khafizova, G.V.; Matveeva, T.V. Agrobacterium-mediated transformation of Nicotiana glauca and Nicotiana sylvestris. Vavilovskii Zhurnal Genetiki I Seleksii 2022, 26, 697–703.</p> <p>13. Matveeva, T.V. New naturally transgenic plants: 2020 update. Biol. Commun. 2021, 66, 36–46.</p> <p>14. Matveeva, T.V. Why do plants need agrobacterial genes? Ecol. Genet. 2021, 19, 365–375.</p> <p>15. Amini G., Sokornova S.V., Mohajjel-Shoja H., Stavrianidi A.N., Rodin I.A., Matveeva T.V. Induced expression of rolC for study of its effect on the expression of genes associated with nicotine synthesis in tobacco // Ecological genetics. - 2020. - Vol. 18. - N. 4. - P. 413-422. doi: 10.17816/ecogen33768</p>
--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Верно

Директор Центра экспертиз



М. А. Ревазов