

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Юрия Николаевича Шкрыля «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)

Актуальность диссертационной работы. Диссертационная работа Ю.Н. Шкрыля посвящена актуальному вопросу биологии и биотехнологии – изучению действия *rol*-генов на разнообразные аспекты функционирования растительных клеток. Несмотря на большой объем исследований генов *rol*, их функции не до конца изучены. Открытыми остаются вопросы о влиянии генов *rol* на экспрессию генов, ответственных за биосинтез вторичных метаболитов, и о стабильности индуцированных ими изменений метаболизма. А между тем эти знания могут быть полезны для создания трансгенных растений, обладающих хозяйственно ценными признаками.

В результате агробактериальной трансформации гены *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD* почвенных бактерий *Rhizobium rhizogenes* интегрируются в геномы растений в составе T-ДНК. Белковые продукты генов *rol* являются регуляторами активности фитогормонов, и их экспрессия в растениях проявляется изменением многих физиологических и морфологических признаков. Консерватизм генов *rol* в природных трансгенных растениях, очевидно, связан с выполнением ими важных биологических функций. Продукты генов *rol* могут не только влиять на ростовые процессы, но и повышать защитные функции растений, а также способствовать синтезу ценных первичных и вторичных метаболитов.

Эффекты *rol*-генов в трансформированных растениях активно изучают с 80-х годов прошлого века, но, несмотря на значительный объем накопленных данных, многие вопросы, касающиеся механизмов и особенностей действия *rol* генов в растениях, на сегодняшний день остаются без ответов. Исследование Ю.Н. Шкрыля является своевременным и востребованным, поскольку дает понимание ряда молекулярных и клеточных механизмов действия агробактериальных генов *rol* и их воздействия на биосинтетические и регуляторные процессы в растительных клетках.

Технологии культивирования трансгенных растений и культур клеток являются перспективными с точки зрения биотехнологии. Растения, трансгенные по генам *rol*, характеризуются устойчивостью к солевому стрессу, низким и высоким температурам, чрезмерному свету и активным формам кислорода. Продукты генов *rol* могут не только влиять на ростовые процессы, но и повышать защитные функции растений, а также

способствовать синтезу ценных вторичных метаболитов в культурах. Особое значение имеет выбор объектов исследования – клеточные культуры лекарственных и модельных растений, которые являются ценным инструментом биотехнологии для исследования молекулярных и физиологических процессов в контролируемых условиях.

Таким образом, актуальность избранной диссертантом темы очевидна, поскольку грамотное использование этого природного феномена в практических целях для повышения защитного потенциала растений и улучшения их биосинтетических свойств возможно только при достаточности знаний о комплексе молекулярных преобразований, которые лежат в основе трансформации растительных клеток *rol*-генами.

Наиболее существенные научные результаты, отвечающие критериям новизны. Результаты, представленные Ю.Н. Шкрылем, носят фундаментальный характер и вносят новое понимание молекулярных механизмов действия агробактериальных генов *rol* на биосинтез вторичных соединений, метаболизм активных форм кислорода (АФК) и устойчивость растительных клеток к абиотическим стрессовым факторам.

Впервые на примере клеточной культуры марены сердцелистной *Rubia cordifolia* охарактеризована способность генов *rol* индуцировать накопление вторичных метаболитов антрахинонов и транскрипцию генов их биосинтеза в процессе длительного культивирования клеток. Установлены ярко выраженные различия в способности генов *rol* поддерживать высокий уровень биосинтеза антрахинонов в трансгенных клеточных культурах. Впервые показано, что гены *rolA* и *rolB* способны длительное время поддерживать высокий уровень биосинтеза антрахинонов в трансгенных клеточных культурах. При этом стимулирующие свойства гена *rolA* усиливаются при длительном культивировании трансгенных клеток, тогда как максимальный эффект активации под действием генов *rolB* и *rolC* проявляется сразу после трансформации и остаётся стабильным на протяжении длительного культивирования клеток. В результате изучения динамики экспрессии ключевых генов биосинтеза антрахинонов впервые получены свидетельства того, что изохоризмат-синтаза является лимитирующим ферментом вторичного метаболизма в *R. cordifolia*.

Исследование связей между уровнями внутриклеточной концентрации АФК и экспрессией генов *rol* является важной и интересной частью работы диссертанта. Выявлены новые аспекты влияния генов *rol* на редокс-статус трансформированных клеток растений за счет подавления продукции внутриклеточных АФК. Впервые установлена способность генов *rolB* и *rolC*, как по отдельности, так и в составе нативной Т-ДНК агробактерий, ингибировать продукцию внутриклеточных АФК. Комбинация защитных реакций в сочетании с эффектом подавления продукции АФК представляет собой

уникальный случай действия одного и того же трансгена. Эта особенность приводит к значительному повышению устойчивости клеток к температурному и солевому стрессу. Повышение устойчивости растений к таким стрессовым воздействиям является важным аспектом биотехнологии растений.

Впервые получены сведения о различиях в молекулярном механизме действий генов *rol*, которые по-разному осуществляют генетическую регуляцию путей генерации и детоксикации АФК трансгенных клеток. Ген *rolC* способствует снижению продукции АФК, ингибируя экспрессию НАДФН-оксидаз, тогда как *rolB* действует как активатор систем генерации и детоксикации. Эти результаты служат примером антагонизма генов *rolB* и *rolC*, что, по мнению автора, являются адаптационным механизмом, выработанным в процессе эволюции взаимоотношений агробактерий и растений-хозяев.

Впервые показано, что ген *rolB* влияет на молекулярный механизм биогенеза микроРНК, активируя экспрессию генов, участвующих в формировании, стабилизации и функционировании этих молекул. Охарактеризовано влияние *rolB* на экспрессию генов, связанных с гормональной регуляцией, защитными реакциями и кальциевой сигнальной системой. Наиболее заметные изменения выявлены в регуляции транскрипционной активности белков теплового шока и некоторых представителей семейства циклофилинов.

Результаты работы позволяют по-новому оценить молекулярные механизмы *rol* – индуцированных воздействий и эффективность генетической трансформации и, таким образом, расширяют наши представления о значимости генов *rol* как регуляторов разнообразных аспектов жизнедеятельности растений, включая гормональный баланс, метаболизм и защитные механизмы организма.

Следует отметить, что диссертационная работа выполнена на высоком теоретическом и методическом уровне. Объем и качество выполненных автором работ свидетельствуют о том, что Ю.Н. Шкрыль умеет сочетать экспериментальные опыты с теоретическим анализом полученного материала, а также проводить комплексные исследования с коллегами разных специальностей, что способствовало получению ценных и глубоких знаний.

Значимость для науки и практики полученных результатов Достигнутое в диссертационной работе понимание ряда механизмов воздействия генов на биосинтетические пути растительных клеток имеет значительную практическую ценность. Способность генов *rol* к активации вторичного метаболизма как в различных видах растений, так и в клеточных культурах открывает большие перспективы использования их в биотехнологии. В клетках лекарственных растений, используя метод генетической трансформации генами *rol*, автором осуществлена эффективная активация

вторичного метаболизма. В клеточной культуре марены сердцелистной *Rubia cordifolia* данный подход позволил многократно увеличить продукцию антрахинонов, обладающих противовоспалительными и антиоксидантными свойствами. В трансформированных корнях кирказона маньчжурского *Aristolochia manshuriensis* активизировалось накопление производных фенантрена, таких как магнофлорин и ряд аристолохиевых кислот, что повышало антиоксидантную и цитотоксическую активность экстрактов этих культур. Установлено, что трансформация клеточных культур резуховидки Таля *Arabidopsis thaliana* геном *rolB* стимулирует биосинтез флавоноидов, и повышает концентрацию индольных глюкозинолатов, не влияя при этом на качественный состав метаболитов.

Получена ценная информация об особенностях взаимодействия *Rhizobium rhizogenes* с растениями в контексте метаболизма активных форм кислорода, что представляет значительный интерес для биотехнологии в связи с потенциальным влиянием АФК на механизмы защиты растений, а также адаптации к неблагоприятным факторам внешней среды. Доказано, что подавление продукции внутриклеточных АФК отдельными генами *rolB* и *rolC*, а также диким штаммом *R. rhizogenes* A4, обеспечивает трансгенным культурам повышенную устойчивость к стрессовым воздействиям среды.

Апробация работы и публикация материалов исследования. Результаты диссертационной работы опубликованы в 31 печатной работе, из которых 17 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК. Материалы диссертации многократно были представлены на международных и российских конференциях.

Общая характеристика диссертационной работы. Диссертационная работа Ю.Н. Шкрыля изложена на 353 страницах. Она состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Хотя «Обсуждение результатов» не выделено в отдельный раздел, тем не менее, раздел вполне логически организован. Список литературы содержит 802 источника. Диссертация иллюстрирована 61 рисунком и 18 таблицами.

Во введении отчетливо обоснована актуальность исследуемой проблемы, сформулирована цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы, а также положения, выносимые на защиту. Задачи, поставленные соискателем, отражают пробелы и противоречия, существующие в современных представлениях о механизмах, лежащих в основе действия генов *rol*. Выполнение поставленных задач потребовало разработки и применения целого ряда методических приемов, включая

широкий спектр разного рода методов биотехнологии, генной инженерии и молекулярной биологии растений.

Обзор литературы хорошо структурирован и дает полное представление о современном состоянии изучаемого круга вопросов, о главных достижениях в данной области и основных путях решения сформулированной проблемы, а также свидетельствует о существовании дискуссионных и недостаточно исследованных вопросов, касающихся молекулярных и клеточных механизмов действия агробактериальных генов *rol* и их воздействия на биосинтетические и регуляторные процессы в растительных клетках. Анализ литературы позволил автору выявить нерешенные вопросы и обосновать цель и задачи исследования.

Глава «Материалы и методы» содержит сведения об объектах исследования, культивировании и трансформации бактерий, получении модельных клеточных культур и растений, определении фармакологической активности. Описание использованных методов показывает, что работа выполнена на современной методической базе, среди которых инструментальные методы анализа, включающие полимеразную цепную реакцию в реальном времени, жидкостную хроматографию с тандемной масс-спектрометрией, а также конфокальную микроскопию и секвенирование ДНК.

В главе «Результаты и обсуждение», состоящей из семи подразделов, автором изложены результаты исследований и проведена разносторонняя дискуссия полученных результатов с учетом данных современной мировой литературы, что является несомненным достоинством данного раздела и показывает высокую эрудицию диссертанта. Результаты работы хорошо документированы, иллюстративный материал обширен и свидетельствует о высоком качестве экспериментальных данных.

В этом разделе приведены результаты исследований влияния генов *rol* на биосинтез вторичных метаболитов в каллусных культурах *Rubia cordifolia* и *Arabidopsis thaliana*, а также трансформированных корнях *Aristolochia manshuriensis*. Установлено, что гены *rol* представляют собой эффективный инструмент в биотехнологии для создания стабильных клеточных культур растений с повышенным содержанием вторичных метаболитов. Результаты испытания фармакологической активности экстрактов из трансгенных клеточных культур, показали высокий уровень противовоспалительной антиоксидантной и цитотоксической активности препаратов из трансформированных растений.

В результате оценки влияния *rolB* и *rolC* на окислительно-восстановительный гомеостаз клеток при оптимальных условиях и при неблагоприятных условиях удалось достоверно доказать того, что *rolB* и *rolC* предотвращают образование АФК в

трансгенных клетках, а их ингибирующий эффект на уровень АФК способствует значительному повышению стрессоустойчивости трансформированных клеток.

Проведен анализ воздействия генов *rol* на транскрипционную активность антиоксидантных генов в клеточных культурах марены сердцелистной, а также на экспрессию их гомологов в культурах резуховидки Таля. Особое внимание уделено НАДФН-оксидазам, специфичным для растений, учитывая, что они отвечают за образование АФК. Результаты идентификации изоформ этих ферментов депонированы в базу данных GenBank. Изучено влияние *rolB* и *rolC* на экспрессию генов НАДФН-оксидаз как в оптимальных условиях, так и при воздействии температурного и солевого стрессов. Обсуждаются полученные результаты по влиянию генов *rol* на экспрессию Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ, которые, как известно, регулируют образование АФК в клетках растений. Проведена оценка влияния гена *rolB* на молекулярный механизм биогенеза микроРНК. Для понимания механизмов, лежащих в основе *rolB*-индуцированных изменений в гормональной и защитной системах, автором был осуществлен поиск и анализ белков-регуляторов, обеспечивающих контроль над реализацией процессов, и изучена их транскрипционная активность.

Наиболее значимые аспекты результатов и обсуждения резюмированы в разделе «Заключение». На мой взгляд, это важный раздел диссертационной работы, позволяющий сформулировать важность решаемой проблемы и обобщить большой экспериментальный материал, полученный автором, а также связать достигнутое понимание молекулярных механизмов действия генов в общую схему. Выводы работы касаются основных, изученных в работе вопросов, они вполне обоснованы и соответствуют полученным результатам. Достоверность научных положений и выводов не вызывает сомнений.

Общие замечания по диссертационной работе. Возникает вопрос о фармакологической активности экстрактов из клеточных культур и частей кирказона. Исследование показало, что содержание аристолохиевых кислот и магнофлорина было заметно выше в стебле кирказона *Aristolochia manshuriensis*, и существенно ниже в нетрансформированных культурах, по сравнению с клеточными культурами трансформированных генами *rolC* и *rolB* (Таблица 5). Однако оценка цитотоксической активности экстрактов, проведенной на четырех клеточных линиях (Рис. 22), не показала зависимости жизнеспособности раковых клеток от уровней метаболитов в экстрактах. Возможно, автор поспешно связывает ингибирующие свойства экстрактов с магнофлорином. Особенно не вписывается в эту концепцию результат, демонстрирующий отсутствие ингибирующего действия экстракта стебля, богатого магнофлорином.

Работа в целом хорошо оформлена, однако есть неточности и ошибки. Говоря о недостатках диссертационной работы, следует отметить не простой стиль изложения.

Положения, выносимые на защиту, сформулированы как полученные результаты. Однако они, скорее, должны представлять собой краткие тезисы, которые являются началом научного исследования, т.е. утверждения, которые были в дальнейшем проверены в ходе экспериментальных исследований.

Обнаруживается некоторая путаница или с названиями генов или с интерпретацией результатов. Это приводит к некоторому несоответствию в описании результатов, выводов и т.д., что затрудняет понимание работы. Так в разделе «Научная новизна» говорится: «Установлено, что гены *rolA* и *rolB* способны длительное время поддерживать высокий уровень биосинтеза антрахинонов в трансгенных клеточных культурах марены сердцелистной (*Rubia cordifolia*)», тогда как из описания результатов следует: «Ген *rolB* оказал наиболее значительное влияние на биосинтез антрахинонов, проявившееся уже на стадии селекции трансгенной культуры и сохранявшееся в процессе последующего культивирования». Далее в Выводах, однако, эта способность указана только для гена *rolA*: «выявлена способность гена *rolA* индуцировать накопление вторичных метаболитов и транскрипцию генов их биосинтеза в процессе длительного культивирования клеток». Кроме этого, хотя глава 3.1.2. называется «Эффекты *rolA* и *rolB* в условиях длительного культивирования трансгенных культур *Rubia cordifolia*», она начинается со слов «Эффект генов *rolB* и *rolC* в культурах клеток марены сердцелистной оказался чрезвычайно устойчивым». Естественно возникает вопрос, это результат ошибочного обозначения генов, или в этих случаях нарушено логическое изложение материала?

В Выводе 2 просматривается противоречие. «Показано, что гены *rolB* и *rolC* активируют накопление производных фенантрена, аристолохиевых кислот и магнофлорина, в трансформированных корнях...», тогда строкой ниже утверждается, что «Важным достоинством *rol*-трансгенных культур является снижение концентрации токсичного соединения – аристолохиевой кислоты I». В этом случае я бы рекомендовала дополнительное разъяснение, касающееся аристолохиевых кислот.

Для оценки статистической достоверности результатов необходимо указывать не только средние значения и стандартные ошибки, но и количество опытов и проведенных оценок. К сожалению, этот важный показатель отсутствует в таблицах и рисунках.

Рекомендую обратить внимание автора, что таблицы и рисунки следует располагать до их упоминания в тексте. Если список литературы составлен по алфавиту, то цитируемые статьи не нумеруют. Ссылки в тексте, как правило, располагают или по алфавиту или в хронологическом порядке. В работе имеется ряд стилистических и

алфавиту или в хронологическом порядке. В работе имеется ряд стилистических и терминологических неточностей. Например, «модель индуцированной гранулемы крыс», «в присутствии различных концентраций NaCl» и др. Тем не менее, все эти неточности и погрешности не имеют принципиального для данной работы характера и не затрагивают сути выполненной работы и её высокого научного значения.

Заключение. Диссертационная работа Ю.Н. Шкрыля «Агробактериальные гены *rol* как активаторы биосинтеза вторичных метаболитов и стрессоустойчивости клеток растений», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки), представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, отражающую результаты многолетних исследований автора, и имеющую важное научное и практическое значение. По актуальности темы, высокому научному и методическому уровню, объему выполненных экспериментальных работ, научной новизне и практической значимости диссертация полностью соответствует критериям, установленным в пп. 9–14 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 «Положение о присуждении ученых степеней» (ред. от 25.01.2024), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор, Юрий Николаевич Шкрыль, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).

Главный научный сотрудник
Лаборатории сравнительной биохимии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского
Дальневосточного отделения Российской академии наук,
г. Владивосток, 690041, ул. Пальчевского, д. 17

доктор биологических наук
(03.00.04 – биохимия),
доцент
(423)2310937
nzhukova35@list.ru

Н. Жукова

Наталья Владимировна Жукова

5 сентября 2024г.



подпись *Н. Жукова*
заверяю: начальник ОДО
Буренина В.Л.

ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН
Входящий № 87
• 09 • 09 2024 г.

Сведения об оппоненте

по диссертационной работе Шкрыля Юрия Николаевича
на тему «Агробактериальные гены *rol* как активаторы биосинтеза
вторичных метаболитов и стрессоустойчивости клеток растений»,
представленной на соискание ученой степени доктора
биологических наук по специальности
1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

Фамилия	Имя	Жукова Наталья Владимировна
Отчество оппонента		
Шифр	и	03.01.04 – биохимия
наименование специальностей, по которым защищена диссертация		
Ученая степень	и	Доктор биологических наук
отрасль науки		
Ученое звание		Доцент
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента		Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения РАН
Занимаемая должность		Главный научный сотрудник лаборатории сравнительной биохимии
Почтовый индекс,	адрес	690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17
Телефон		8 (423) 2310905
Адрес электронной почты		nzhukova35@list.ru
Список основных публикаций официального оппонента по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)		<p>1. Zhukova N.V., Yakovleva I.M. Low light acclimation strategy of the brown macroalga <i>Undaria pinnatifida</i>: significance of lipid and fatty acid remodeling for photosynthetic competence // Journal of Phycology. 2021. Vol. 57, P. 1792–1804.</p> <p>2. Zhukova N.V., Eliseikina M.G., Balakirev E.C., Ayala F.J. Multiple bacterial partners in symbiosis with the nudibranch mollusk <i>Rostanga alisae</i> // Scientific Reports. 2022. Vol. 12, 169.</p> <p>3. Nedashkovskaya O., Otstavnykh N., Zhukova N., Guzev K., Chausova V., Tekutyeva L., Mikhailov V., Isaeva M. <i>Zobellia barbeyronii</i> sp. nov., a new member of the family Flavobacteriaceae, isolated from seaweed, and emended</p>

description of the species // Diversity-Basel. 2021.Vol. 13, 520.

4. Nedashkovskaya O., Otstavnykh N., Balabanova L., Bystritskaya E., Kim S.-G., Zhukova N., Tekutyeva L., Isaeva M. *Rhodoalgimonas zhirmunskyi* gen. nov., sp. nov., a marine Alphaproteobacterium isolated from the Pacific red alga *Ahnfeltia tobuchiensis*: phenotypic characterization and pan-genome analysis // Microorganisms. 2023. Vol. 11, 2463.

5. Nedashkovskaya, O.I., Kukhlevskiy, A.D., Kim, SG., Otstavnykh N. Y., Zhukova N. V., Isaeva M. P. *Aureibaculum algae* sp. nov. isolated from the Pacific red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* // Archives of Microbiology. 2022. Vol. 204, 153.

6. Nedashkovskaya O.I., Kim S-G., Balabanova L.A., Zhukova N.V., Son O.M., Tekutyeva L.A., Mikhailov V.V. Genome-based classification of strain 16-SW-7, a marine bacterium capable of converting B red blood cells, as *Pseudoalteromonas distincta* and proposal to reclassify *Pseudoalteromonas paragorgicola* as a later heterotypic synonym of *Pseudoalteromonas distincta* // Frontiers in Microbiology. 2022. Vol. 12, 809431.

7. Nedashkovskaya O., Balabanova L., Otstavnykh N., Zhukova N., Detkova E., Seitkalieva A., Bystritskaya E., Noskova Y., Tekutyeva L., Isaeva M. In-Depth Genome Characterization and pan-genome analysis of strain KMM 296, a producer of highly active alkaline phosphatase; proposal for the reclassification of *Cobetia litoralis* and *Cobetia pacifica* as the later heterotypic synonyms of *Cobetia amphilecti* and *Cobetia marina*, and emended description of the species *Cobetia amphilecti* and *Cobetia marina* // Biomolecules. 2024. Vol. 14, 196.

8. Zhukova N.V. Fatty acids of echinoderms: diversity, current applications and future opportunities // Marine Drugs. 2023. Vol. 21, 21.

9. Zhukova, N.V. Fatty acid analysis reveals variations in the diet of shallow-water spionids (*Annelida: Polychaeta: Spionidae*) // Marine Biology. 2023. Vol. 170, 162.

И.о Учёного секретаря НИЦМБ ДВО РАН

 И.В. Епур

«12» апреля 2024 г.

