

Отзыв

официального оппонента доктора биологических наук Кулуева Булата Разяповича на диссертационную работу Шкрыля Юрия Николаевича «Агробактериальные гены *rol* как активаторы биосинтеза вторичных метаболитов и стрессоустойчивости клеток растений», представленную в диссертационный совет 99.0.064.02 на базе ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки)

Актуальность исследования

Гены *rol Rhizobium rhizogenes* это наиболее яркий пример генов, функции которых начали изучать еще в 20 веке, но до сих пор молекулярные механизмы действия их белковых продуктов остаются не до конца выясненными. За эти годы накопились сведения о позитивном влиянии экспрессии *rol*-генов не только на рост, но и на вторичный метаболизм, антиоксидантную систему и стрессоустойчивость растений. Такое многообразное и сложное влияние *rol*-генов на метаболизм растений требует одновременно как комплексного подхода для их изучения, так и более глубокого анализа молекулярных механизмов. Диссертационное исследование Юрия Николаевича Шкрыля посвящено выявлению молекулярных механизмов действия агробактериальных генов *rol* на биосинтез вторичных соединений, метаболизм АФК и устойчивость растительных клеток к абиотическим стрессовым факторам. Данная работа представляется актуальной для фундаментальной науки, так как позволяет приблизиться к пониманию функций *rol*-генов, а также конкретных механизмов влияния их белковых продуктов на вторичный метаболизм и стрессоустойчивость. Также представляет интерес выявление и анализ регуляторных сетей, которые активируются при экспрессии *rol*-генов. Все эти исследования важны для понимания механизмов функционирования клеточного сигналинга растений и вносят вклад в развитие системной биологии в целом. Кроме того, результаты диссертационного исследования представляют большой практический интерес для биотехнологии растений, а именно для использования растений в качестве продуцентов различных биологически активных веществ. При этом весьма актуальна точная идентификация и количественный анализ конкретных соединений вторичного метаболизма. Исходя из этого, диссертационное исследование Ю.Н. Шкрыля актуально с точки зрения фундаментальной науки, но также имеет высокое практическое значение.

Структура диссертационной работы

Диссертация Ю.Н. Шкрыля изложена на 353 страницах текста, состоит из Введения, главы «Обзор литературы», главы «Материалы и методы», главы «Результаты и обсуждение», Заключения, Выводов и Списка литературы. Работа иллюстрирована 61 рисунками и содержит 18 таблиц. Список литературы насчитывает 802 наименования, из которых 799 на английском языке.

Во введении Ю.Н. Шкрыль дает обоснование актуальности выбранной темы, четко определяет цель работы (выявление молекулярных механизмов действия агробактериальных генов *rol* на биосинтез вторичных соединений, метаболизм АФК и устойчивость растительных клеток к абиотическим стрессовым факторам) и формулирует задачи, необходимые для достижения поставленной цели, приводит положения, выносимые на защиту, дает авторскую оценку научной новизны и практической значимости выполненной научно-исследовательской работы. Диссертационная работа характеризуется высоким уровнем личного вклада соискателя во всех проведенных экспериментальных работах. Основные результаты были получены лично автором, либо под его непосредственным руководством. Диссертационная работа прошла апробацию на 11 российских и международных научных конференциях, результаты исследования изложены в 31 публикации, из которых 20 – статьи в журналах, рекомендованных перечнем ВАК. Весьма примечательной и положительной стороной работы является то, что результаты исследования опубликованы в высокорейтинговых журналах, к примеру, это журналы *Pharmaceutical Chemistry Journal*, *Biotechnology and Bioengineering*, *Planta*, *Plant Cell Reports*, *Plant Physiology*, *Plant Physiology and Biochemistry*, *Scientific Reports*, *Plant Gene* и другие. Однако среди публикаций в журналах нет ни одного российского журнала, поэтому можно сделать пожелание диссертанту публиковать результаты своих исследований и в отечественных журналах.

В литературном обзоре диссертант подробно освещает современное состояние изучаемой проблемы. Первая часть обзора литературы посвящена описанию природного механизма переноса генов агробактериями. Здесь также дается представление о растительных белках-переносчиках Т-ДНК. Далее следует описание агробактериальных и растительных *plast* генов, в том числе генов *rol*. Вторая часть обзора литературы посвящена подробному освещению кальциевой, НАДФН-оксидазной сигнальных систем и роли АФК в процессах регуляции. В этой части подробно описываются компоненты, структура, механизмы действия, физиологическая роль рассматриваемых систем. Третья часть обзора литературы посвящена описанию известных вторичных метаболитов объектов исследования - *Arabidopsis thaliana*, *Rubia cordifolia*, *Aristolochia manshuriensis*.

Обзор литературы очень подробный, написан понятным языком, содержит много современной научной информации и может быть рекомендован для использования в учебном процессе у студентов биологических специальностей. При прочтении обзора формируется общее представление об известной информации о *rol*-генах, клеточной сигнализации и вторичном метаболизме.

Необходимо отметить, что Ю.Н. Шкрыль провел весьма значительную аналитическую работу с большим числом литературных данных, в том числе опубликованных за последние 5 лет, которые включены в список цитированной литературы. Обзор литературы непосредственно связан с предметом исследований и в нем достаточно полно отражены современные тенденции исследований функций *rol*-генов и их влияния на клеточную сигнализацию, стрессоустойчивость и вторичный метаболизм. При прочтении обзора литературы возникает понимание научной новизны и практической значимости диссертационной работы. В целом ознакомление с обзором литературы подводит читателя к существованию большого числа вопросов и проблем в рассматриваемой области, на решение которых и была направлена диссертационная работа Ю.Н. Шкрыля.

В главе «Материалы и методы» приведены краткая характеристика объектов исследования и описание всех использованных в ходе работы методов. Работа характеризуется использованием современных методов биотехнологии и физико-химической биологии. Положительной особенностью диссертационной работы является широкое использование трансгенных модельных систем, а также точная идентификация и определение содержания вторичных метаболитов. Диссертантом также применялись методы оценки фармакологической активности экстрактов анализируемых растений. В главе 2 описываются методы анализа АФК с помощью лазерной конфокальной микроскопии, методы идентификации и анализа различных генов, а также определения их уровня экспрессии. В целом, протоколы в главе «Материалы и методы» описаны достаточно подробно и позволяют провести повторные эксперименты другими исследователями.

Самая большая глава диссертационной работы посвящена описанию результатов исследования и их обсуждению. Первая часть главы 3 посвящена описанию и обсуждению результатов изучения влияния генов *rol* на биосинтез вторичных метаболитов *Arabidopsis thaliana*, *Rubia cordifolia*, *Aristolochia manshuriensis*. Кроме того, здесь же приводятся результаты исследования фармакологической активности экстрактов изучаемых растений. Первая часть этой главы завершается обсуждением полученных результатов с привлечением литературных данных. Вторая часть главы посвящена описанию результатов изучения влияния генов *rol* на содержание АФК и устойчивость трансгенных культур к абиотическим стрессам. Здесь же описаны результаты исследования внутриклеточной локализации белка

rolC. После описания этих результатов идет их обсуждение. Третья часть главы посвящена описанию результатов изучения влияния генов *rol* на экспрессию генов антиоксидантных ферментов. Здесь описываются работы по идентификации и анализу экспрессии генов антиоксидантных ферментов у *Rubia cordifolia* и в конце также дается обсуждение полученных результатов. Четвертая часть главы посвящена описанию результатов изучения влияния генов *rol* на экспрессию генов НАДФН-оксидазы *Rubia cordifolia*. Здесь также описываются результаты идентификации и анализа экспрессии генов НАДФН-оксидазы *Rubia cordifolia* и далее дается обсуждение полученных результатов. Пятая часть главы 3 посвящена описанию результатов и обсуждению исследований влияния генов *rol* на экспрессию генов Ca²⁺-зависимых протеинкиназ. В главе 3 также даны результаты и обсуждение работ по изучению влияния гена *rolB* на молекулярный механизм биогенеза микроРНК и на экспрессию генов, связанных с гормональной регуляцией и защитой растений.

После главы 3 дается заключение по всем полученным в ходе работы результатам исследования. В заключении говорится об актуальности работы и кратко перечисляются самые важные результаты исследования. Здесь же дается авторская схема функционирования генов *rol*, включающая гормоны, АОС, АФК, НАДФН-оксидазы, Ca²⁺-зависимые протеинкиназы и микроРНК. Благодаря этой схеме и ее описанию возникает общее представление о функционировании сигнальной сети клеток растений, в которые вовлекаются белковые продукты генов *rol*.

Выводов приводится 8, сформулированы они четко, непосредственно вытекают из полученных данных и понятны для читателя. Диссертационная работа Ю.Н. Шкрыля написана хорошим научным и понятным языком, все экспериментальные данные сведены в таблицы и рисунки и обсуждены с привлечением широкого круга литературных данных. В целом, в тексте допущено довольно мало ошибок, текст изложен в логичном порядке и при прочтении возникает четкое убеждение о целостности и завершенности диссертационной работы.

После чтения всей диссертационной работы необходимо отметить основные положительные моменты. В обзоре литературы очень подробно описаны пути биосинтеза вторичных метаболитов и их полезные для человека свойства. Важным является выявленный факт сохранения эффекта генов *rol* на вторичный метаболизм на протяжении длительного культивирования трансгенных клеточных культур. Важное значение для фундаментальной науки имеет идентификация и депонирование в GenBank генов кальций-зависимых протеинкиназ, НАДФН-оксидаз, антиоксидантных ферментов, генов биосинтеза антрахинонов *Rubia cordifolia*. Интересен выявленный факт, что при совместной экспрессии *rolC* способен компенсировать негативное влияние *rolB* на пролиферацию клеток. Определена локализация белка *rolC* – в цитоплазме и ядре, что важно для понимания его функций. Раскрыт

молекулярный механизм действия генов *rol* на метаболизм АФК. Ген *rolB* активирует как прооксидантные (НАДФН-оксидазы), так и антиоксидантные гены (аскорбатпероксидазы, супероксиддисмутаза и каталазы), тогда как *rolC* ингибирует активность НАДФН-оксидазы, не затрагивая антиоксидантную защитную систему. Кроме того, обнаружена дифференциальная регуляция изоформ кальций-зависимых протеинкиназ, обеспечивающая снижение уровня внутриклеточных АФК. Полученные соискателем результаты доказывают участие кальций-зависимых протеинкиназ в процессах *rol*-опосредованной модуляции биохимических и физиологических изменений. В целом, диссертационное исследование Ю.Н. Шкрыля это фундаментальный и довольно сложный научный труд, так как там описывается большое количество экспериментов и исследований, а полученные результаты тщательно обсуждаются с привлечением литературных сведений.

Научная новизна и практическая значимость полученных результатов

Научная новизна диссертационной работы заключается в том, впервые показано, что гены *rolA* и *rolB* способны длительное время поддерживать высокий уровень биосинтеза антрахинонов в трансгенных клеточных культурах марены сердцелистной, причем *rolA* в отличие от *rolB* вызывает постепенное повышение их уровня продукции в процессе культивирования трансгенных клеток. Впервые выявлена способность генов *rol*, как по отдельности, так и в составе нативной Т-ДНК агробактерий, ингибировать продукцию внутриклеточных АФК, что может лежать в основе стрессоустойчивости трансгенных по генам *rol* растений и их культур. Впервые охарактеризовано воздействие гена *rolB* на биогенез микроРНК, а также экспрессию белков теплового шока и циклофилинов, связанных с гормональной регуляцией и защитными реакциями растений. В рамках диссертационной работы впервые идентифицированы и проанализированы гены НАДФН-оксидаз, Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ и антиоксидантных ферментов *Rubia cordifolia* и впервые показана их взаимосвязь с генами *rol*. Результаты исследования Ю.Н. Шкрыля могут быть использованы при разработке биотехнологий культивирования растительных культур *Rubia cordifolia* для получения антрахинонов и *Aristolochia manshuriensis* для получения магнофлорина.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов диссертационной работы

Использование для исследований современных методов биотехнологии и физико-химической биологии таких как жидкостная хроматография с тандемной масс-

спектрометрией, гено-инженерные технологии, секвенирование, конфокальная микроскопия и др. подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в работе Ю.Н. Шкрыля, а также выносимых на защиту положений и выводов. Во всех исследованиях выборка достаточна, а выбранные методы статистического анализа правильные. Приведенные данные в таблицах и гистограммах позволяют проверить соответствующими методами правильность расчетов, сделанных диссертантом. Автор тщательно проверяет полученные данные, оценивает достоверность различий с использованием стандартных методов статистики. Таким образом, полученные Ю.Н. Шкрылем научные результаты и выводы являются обоснованными и достоверными. Следует отметить и то, что основные результаты диссертации Ю.Н. Шкрыля опубликованы в высокорейтинговых журналах, а также апробированы в научных конференциях. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

В ходе чтения к диссертационной работе возникли следующие вопросы:

1. Экспрессия *rolB* способствует активации всех изученных ключевых генов биосинтеза флавоноидов у арабидопсиса, однако флавоноиды в трансгенной каллусной культуре не обнаруживаются. С чем это связано?

2. Выбор для подробного молекулярного анализа модельного объекта арабидопсиса понятен, так как позволяет определить уровни экспрессии широкого круга различных генов. В то же время, судя по всему, вторичный метаболизм в каллусной культуре арабидопсиса подавлен и под влиянием *rol*-генов не активируется. Почему тогда проводился анализ вторичных метаболитов в каллусной культуре арабидопсиса?

3. В диссертации отмечается, что несмотря на значительное подавление продукции АФК, ген *rolC* не ухудшает рост трансформированных клеток в обычных условиях культивирования. С чем может быть связано предполагаемое автором улучшение роста растений при увеличении продукции АФК? Или здесь имелось ввиду другое?

4. С чем может быть связан отрицательный, в том числе некротический эффект трансгена *rolB*?

5. Чем объясняется выбор генов аскорбатпероксидаз, супероксиддисмутаза и каталаза при анализе экспрессии генов антиоксидантной системы?

6. В диссертации несколько раз упоминаются схожие морфогенетические эффекты между генами *rolC* и *bb*. Эти гены филогенетически и функционально близки друг к другу?

7. На стр. 19 отмечается, что поскольку контрольная линия R не выживает на среде с добавлением 120 mM NaCl, данные для культур *R. cordifolia* отсутствуют. Почему не использовали меньшие концентрации соли?

К диссертационной работе имеется несколько замечаний.

Несмотря на то, что русскоязычный термин, обозначающий «hairy roots» окончательно не принят научным сообществом России, все же правильнее использовать термин «волосовидный корень», предложенный российским фитопатологом И.Л. Сербиновым еще в 1912 году. В главе 1 «Обзор литературы» нет заключения, который должен подвести к цели исследования. В главе 2 «Материалы и методы» не обоснован выбор референсных генов для ОТ-ПЦР. Результаты анализов ОТ-ПЦР в русскоязычной литературе чаще всего обозначают в виде показателя «относительное содержание транскриптов», но не «уровень экспрессии». Используется термин «степень гомологии», однако гомология – понятие качественное, а не количественное. Гомология есть или нет. По всему тексту диссертации процитировано всего лишь три русскоязычных источника. Это очень мало. Седьмой вывод следовало бы конкретизировать, из вывода неясно какие именно белки теплового шока и циклофилины активизировались.

Также можно отметить несколько замечаний редакторского характера:

1. Стр. 29. промотора вируса 35S табачной мозаики – видимо вируса мозаики цветной капусты?
2. Стр. 36. *Lunaria vulgaris* не львиный зев, а льнянка обыкновенная.
3. Стр. 65. которые катализируют супероксид анион-радикалов – пропущено слово «превращение»
4. Стр. 91. вызывают значительный интерес
5. Стр. 108. с омошью 0,5% раствора
6. (Евроген, Москва) - (Евроген, Россия)

Сделанные в отзыве замечания не влияют на актуальность, новизну, практическую значимость и фундаментальный характер полученных выводов диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Юрия Николаевича 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) является законченным научным исследованием, в котором получены данные о влиянии генов *rol* на процессы роста, стрессоустойчивости и биосинтез вторичных метаболитов культур клеток и нативных

растений. По актуальности темы, научному уровню, теоретической и практической значимости результатов диссертация отвечает требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018 с изм. от 26.05.2020), а ее автор Шкрыль Юрий Николаевич заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки).

доктор биологических наук
по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология,
ведущий научный сотрудник лаборатории геномики растений
Института биохимии и генетики – обособленного структурного
подразделения Федерального государственного бюджетного
научного учреждения Уфимского федерального исследовательского
центра Российской академии наук

Булат Разяпович Кулуев

15.08.2024 г.

Адрес: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71
ibg.anrb.ru, e-mail: molgen@anrb.ru, kuluev@bk.ru
Тел.: +7 (347) 2356100, +7 (347) 2356088

Подпись Кулуева Б.Р. заверяю,
ио директора ИБГ УФИЦ РАН



Карунас А.С.

ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН
Входящий № <u>83 а</u>
« <u>04</u> » <u>08</u> 20 <u>24</u> 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 Отчество оппонента	Кулуев Булат Разяпович
Шифр и наименование специальностей, по которым защищена диссертация	03.01.03 – молекулярная биология
Ученая степень и отрасль науки	Доктор биологических наук, молекулярная биология
Ученое звание	нет
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента	Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
Занимаемая должность	Ведущий научный сотрудник лаборатории геномики растений
Почтовый индекс, адрес	450054, г. Уфа, Проспект октября, 71
Телефон	+7 (347) 235-61-00
Адрес электронной почты	kuluev@bk.ru
Список основных публикаций официального оппонента по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	1. Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Kuluev B.R. , Kiryanova O.Y., Gumerova G.R., Knyazev A.V., Vershinina Z.R., Mikhailova E.V., Chemeris D.A., Matniyazov R.T., Baimiev A.K., Gubaidullin I.M., Baimiev A.K., Chemeris A.V. Design of guide RNA for CRISPR/Cas plant genome editing // Molekuliarnaia biologii. 2020. Vol. 54, No. 1, P. 29–50. 2. Vysotskaya L., Akhiyarova G., Feoktistova A., Akhtyamova Z., Korobova A., Ivanov I., Dodd I., Kuluev B. , Kudoyarova G. Effects of phosphate shortage on root growth and hormone content of barley depend on capacity of the roots to accumulate ABA // Plants. 2020. Vol. 9, No. 12, 1722.

Mikhaylova E.V., Artyukhin A., Musin K., Panfilova M., Gumerova G., **Kuluev B.** The first report on the induction of hairy roots in trapa natans, a unique aquatic plant with photosynthesizing roots // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2021. Vol. 144, No. 2, P. 485–490.

3. Musin K.G., Fedyaev V.V., **Kuluev B.R.** State of antioxidant system and long-term storage of tobacco hairy roots with constitutive expression of glutathione-s-transferase gene *ATGSTF11* // Russian Journal of Plant Physiology. 2021. Vol. 68, P. 641–651.

4. Korobova A., **Kuluev B.**, Möhlmann T., Veselov D., Kudoyarova G. Limitation of cytokinin export to the shoots by nucleoside transporter ENT3 and its linkage with root elongation in Arabidopsis // Cells. 2021. Vol. 10, No. 2, 350.

5. Mikhaylova E., Khusnutdinov E., Shein M.Y., Alekseev V.Y., Nikonorov Y., **Kuluev B.** The role of the *GSTF11* gene in resistance to powdery mildew infection and cold stress // Plants. 2021. Vol. 10, No. 12, 2729.

6. **Kuluev B.R.**, Mikhailova E.V., Kuluev A.R., Galimova A.A., Zaikina E.A., Khlestkina E.K. Genome editing in species of the tribe Triticeae with the CRISPR/Cas system // Molekuliarnaia biologiya. 2022. Vol. 56, No. 6, P. 949–968.

7. Lastochkina O., Ivanov S., Petrova S., Garshina D., Lubyanova A., Yuldashev R., **Kuluev B.**, Zaikina E., Maslennikova D., Allagulova C., Avtushenko I., Yakupova A., Farkhutdinov R. Role of endogenous salicylic acid as a hormonal intermediate in the bacterial endophyte *Bacillus subtilis*-induced protection of wheat genotypes contrasting in drought susceptibility under dehydration // Plants. 2022. Vol. 11, No. 23, 3365.

8. Sharipova G., Ivanov R., **Kuluev B.**, Akhiyarova G., Veselov D., Kudoyarova G. Effects of constitutive expression of barley aquaporin gene, *HVPIP2;1*, on water relations and growth of tobacco plants under normal conditions and salinity and their linkage with capacity for osmotic adjustment // Russian Journal of Plant Physiology. 2022. Vol. 69, No. 1, P. 10.

9. Musin K.G., Gumerova G.R., Baimukhametova

