

Отзыв официального оппонента
Щеголева Сергея Юрьевича
на диссертацию
Хапчаевой Софьи Арсеновны
на тему: «Генетическое маркирование клубеньковых бактерий и способы повышения
эффективности бобово-ризобиального симбиоза»,
представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.02.03 – микробиология

Большой интерес с фундаментальной и прикладной точек зрения в изучении эволюции земной биоты и применении этих знаний для развития разнообразных биотехнологий представляют **растительно-микробные** взаимодействия. С ними связывают решение проблем повышения плодородия почв, эффективного растениеводства, расширения спектра природных физиологически активных веществ для медицины и ветеринарии, экологических биотехнологий и т.д.

Особое место среди них занимает **бобово-ризобиальный** симбиоз, отличающийся высокой степенью интегрированности партнеров с возникновением и закреплением в эволюции у бобовых растений клубеньков – мест скопления и функционирования почвенных бактерий, представителей семейства *Rhizobiaceae*. Последние обеспечивают растения азотным и минеральным питанием, другими физиологически активными веществами, важными для их существования. Но несмотря на то, что данный феномен привлекает внимание специалистов уже более ста лет, многие вопросы, касающиеся его молекулярных и клеточных механизмов, идентификации и анализа микробиологических партнеров, требуют **дальнейших исследований и уточнений**. В том числе подходы к оценкам специфичности и эффективности бобово-ризобиального симбиоза, биоразнообразие его участников, влияние на него факторов биотического и абиотического происхождения, проблемы их систематики и **геносистематики**.

Одним из вызовов последних лет в этой области, особенно ярко проявившихся в связи с бурным развитием биоинформатических ресурсов, стало выявление низкой эффективности (неоднозначности) традиционных филогенетических тестов в рамках парадигмы «один ген – один маркер». К примеру, разработчиками популярного ресурса SILVA в работе Yarza et al. (*Nat. Rev. Microbiol.* 2014. Vol. 12. P. 635-645) был сделан прогноз, согласно которому скорость определения новых видов прокариот по 16S рРНК к концу 2017 г. должна была приблизиться к нулю.

Таким образом, имеются все основания признать тему диссертационного исследования С.А. Хапчаевой весьма **актуальной**. Его главной целью было повышение **разрешающей способности** геносистематики ризобий на видовом и внутривидовом уровне, направленное на развитие подходов к повышению **эффективности** бобово-ризобиального симбиоза. Достаточно убедительно это иллюстрируют основные **положения**, вынесенные автором диссертации на защиту:

1. Генетический маркер *hin*-регион – перспективный таксономический маркер для идентификации и оценки внутривидового разнообразия бактерий рода *Rhizobium* и выявления сорт-штаммовой специфичности бобово-ризобиального симбиоза.
2. Применение микроводорослей и цианобактерий при создании консорциумов полезных микроорганизмов приводит к стабилизации состава комплексного биопрепарата.
3. Предложен способ повышения эффективности бобово-ризобиального симбиоза посредством разработки персонализированных формул полифункциональных биопрепаратов.

Для достижения поставленных целей диссертанткой решались следующие конкретные задачи:

1. Изучить биоразнообразие микросимбионтов бобовых культур: фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*), сои культурной (*Glycine max*) и растений трибы *Viciae* (*Vicia*, *Pisum*, *Lens*, *Lathyrus*) при помощи анализа данных мультилокусного секвенирования (MLSA) и saAFLP.
2. Определить уровень генетического полиморфизма по каждому из маркеров (генов 16S рРНК, *rpoB*, *nodD*, *nodC*, *nifH*; межгенного региона 16-23S рРНК), в т.ч. провести сравнительную оценку структуры и полиморфизма *hin*-региона.
3. Изучить в рамках лабораторных испытаний особенности бобово-ризобияльного симбиоза, как предпосылку сорт-штаммовой специфичности.
4. Оценить возможность использования микроводорослей и цианобактерий при создании консорциумов полезных микроорганизмов, их влияние на эффективность действия и стабильность состава таких биопрепаратов в процессе хранения.
5. Апробировать в рамках полевых опытов гипотезу создания персонализированных формул биопрепаратов под бобовые культуры.

Диссертация написана по традиционной, вполне удобной для восприятия схеме на 125 страницах, состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка публикаций по теме диссертации (10 наименований, включая 2 статьи из изданий, индексируемых в **Scopus** и **WoS**, 2 патента, 5 статей из изданий, индексируемых в **РИНЦ**), списка литературы (176 наименований) и трех приложений с подробным описанием исследованных объектов.

Во **введении** обоснована актуальность работы, сформулирована ее цель, решаемые задачи и вынесенные на защиту положения.

В **главе 1**, обзоре литературы, рассмотрены данные, характеризующие специфичность растительно-микробных взаимодействий, генетические основы образования клубеньков у бобовых растений, таксономию клубеньковых бактерий, биоразнообразие бактерий порядка *Rhizobiales* и соответствующие методы исследования, способы повышения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза. Данный обзор вполне **адекватен** поставленным в работе целям и решаемым задачам.

В **главе 2** дано описание использованных в работе объектов и методов исследования. Последние характеризуются должным **разнообразием** и включают представительный набор микробиологических, физиолого-биохимических, молекулярно-генетических и биоинформатических методов.

Глава 3 посвящена изложению полученных автором диссертации **результатов** и их обсуждению. В ней представлены данные, характеризующие **биоразнообразие** микросимбионтов сельскохозяйственно-значимых бобовых культур: фасоли, растений трибы *Viciae* (горох, бобы), сои. С помощью предложенных маркеров для экспресс-идентификации и дифференциации симбионтов растений определены **генетически обособленные** группы штаммов. С использованием филогенетических маркеров из коровой и аксессуарной частей пангенома охарактеризован уровень внутри- и межвидового нуклеотидного **полиморфизма** микросимбионтов ряда бобовых культур. По одному из них – *hin*-региону, показавшему заметное увеличение **разрешающей способности** таксономии, существенно расширена база данных и проведена ревизия таксономического положения исследуемых штаммов рода *Rhizobium*. Проведенные лабораторные испытания, с учетом результатов определения генотипов клубенек-образующих единиц, позволили охарактеризовать **сорт-штаммовую специфичность** бобово-ризобияльного симбиоза с предположительно различающейся эффективностью. Продемонстрировано, что создание **консорциу-**

мов полезных микроорганизмов с микроводорослями и цианобактериями обеспечивает **стабилизацию** состава комплексных биопрепаратов на основе ризобий. В условиях полевого опыта показана эффективность **объектно-ориентированной** методики создания формул биопрепаратов для бобовых культур. Для конкурентоспособных штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* установлена **сцепленность** хромосомного маркера *hin*-региона с RFLP-профилем симбиотического *nodD*-гена. Для семян фасоли обнаружено **расщепление** их морфотипа по цвету и форме, предположительно связанное с **генотипами** интродуцированных штаммов клубеньковых бактерий. Для сортов сои отечественной селекции Зуша и Красивая Меча установлена максимальная эффективность биоудобрений, полученных на основе штаммов генотипа USDA 110.

Сделанные автором **выводы** достаточно ясны и информативны, а **автореферат** диссертации вполне адекватен ее содержанию. **Обоснованность** научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в работе С.А. Хапчаевой, обеспечена соответствующей проработкой диссертанткой основополагающих теоретических представлений о бобово-ризобиальном симбиозе, методологии его изучения. **Достоверность** полученных экспериментальных данных гарантируется разнообразием и надежностью использованных методов исследования, их согласованностью с поставленными в диссертации задачами.

Не вызывает сомнений **научная новизна** полученных в данной диссертационной работе результатов. В ней **впервые** дана сравнительная оценка структуры и полиморфизма *hin*-региона для микросимбионтов фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) и растений трибы *Vicieae*. Показана перспективность использования данного маркера в систематике и таксономии ризобий. В частности, для симбионтов растений трибы *Vicieae* **впервые** был выявлен генотип HF (Heavy Fragment), присутствующий у аборигенных ризобий, обладающих повышенной конкурентоспособностью. **Впервые** обнаружена сцепленность хромосомного маркера *hin*-региона с плазмидным *nodD*-геном штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. В полевых испытаниях установлена фенотипическая изменчивость фасоли обыкновенной с расщеплением морфотипа семян по цвету, форме и содержанию белка, предположительно связанным с генотипами интродуцированных штаммов клубеньковых бактерий. **Впервые** научно обоснован способ повышения эффективности бобово-ризобиального симбиоза с разработкой объектно-ориентированных формул полифункциональных биопрепаратов.

Очевидна также и **практическая значимость** результатов данной диссертационной работы, поскольку предложенные в ней **экспресс-методики** идентификации и дифференциации штаммов клубеньковых бактерий позволяют (в совокупности с вегетационными испытаниями) выявлять штаммы, перспективные для использования в качестве основы **биопрепаратов** для бобовых культур. В ней определены перспективные **штаммы**, эффективные в азотфиксирующем симбиозе с горохом и соей (**депонированы** во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов). Доказана эффективность **консорциумов** полезных микроорганизмов с микроводорослями и цианобактериями, обеспечивающих стабилизацию состава комплексных биопрепаратов на основе ризобий. **Биотехнология** получения микробных полифункциональных препаратов, разработанная в ходе выполнения исследований, представленных в рассматриваемой диссертации, поддержана рядом специализированных научных фондов РФ.

При изучении диссертации и относящихся к ней материалов у оппонента возник ряд замечаний и вопрос.

1. Автору следовало уделить больше внимания тому, что использованные и развитые ею филогенетические тесты на основе MLSA с последовательностями генов 16S рРНК, *gyrB*, *rpoB*, интергенного спейсера ITS и *hin*-региона оперируют с маркерами из **коро-**

- вой** (вертикально наследуемой) части пангенома. При том что многие отмечаемые в работе фенотипические признаки контролируются генами из его **акцессорной** (подвижной) части, куда входят также симбиотические гены *nodD*, *nodC*, *nifH* и *nifD-K*. Её состав в преобладающей степени зависит от **горизонтального переноса** генов, исчерпывающий корректный учет которого в геносистематике прокариот остается пока **трудно решаемой** задачей (Washburne A.D. et al. *Nat. Microbiol.* 2018. Vol. 3. P. 652-661). Так что выявление и анализ *gum*-генов имеет значение скорее для оценки **функциональной** значимости исследуемых штаммов, в то время как для таксономических исследований больше подходят перечисленные выше «гены домашнего хозяйства».
2. На стр. 52 диссертации и далее приведено **пороговое значение** внутривидового полиморфизма (идентичность $\geq 90\%$) при сравнении нуклеотидных последовательностей *hin*-региона. Каков был **объем выборки** (количество геномов или пар последовательностей) при определении этого критерия, каков его **доверительный интервал** и статистическая достоверность?
 3. В диссертации продемонстрирована эффективность тестов на основе мультилокусного анализа последовательностей MLSA, *hin*-региона как генетического маркера и saAFLP для **качественного** разделения операционных таксономических единиц (ОТЕ) внутри (и между) той или иной клады (монофилетической группы). Однако данные тесты не обладают статистически обоснованными **количественными** критериями для отнесения исследуемых ОТЕ к конкретным таксономическим категориям (родам, видам, подвидам и т.п.). На весьма обширном статистическом материале (тысячи последовательностей) таковые определены в тестах 16S рРНК (эффективен, однако, лишь при идентичности последовательностей $< 97\%$, т.е., от родового уровня и выше), AAI (средней аминокислотной идентичности, не упомянутый в диссертации), ANI и ДНК-ДНК гибридизации *in silico* (DDH) (отмеченные в литературном обзоре). Последний позволяет **количественно** регистрировать внутривидовые различия между ОТЕ по критерию DDH $< 79\%$ с соответствующими **статистическими** оценками. Принимая во внимание ограниченность набора результатов полногеномного секвенирования ДНК для референтных геномов ризобий, можно было бы, тем не менее, попытаться провести подобный анализ хотя бы для отдельных показательных объектов.
 4. Было бы целесообразным **сопоставить** оценки таксономического положения исследуемых штаммов, полученные с помощью теста на основе анализа *hin*-региона и др., с результатами филогенетических исследований прокариот в рамках **наиболее развитой** в качественном и количественном отношении (около 130 тыс. бактериальных геномов на конец 2018 г.) технологии GTDB (Parks D.H. et al. *Nat. Biotechnol.* 2018. Vol. 36. P. 996-1004). В указанной публикации отмечается, в частности, выявленная авторами необходимость таксономической **переклассификации** около **60%** исследованных ими объектов. Так что утверждение автора диссертации в обзоре литературы на стр. 19 о том, что «переход к описанию новых видов на основе генома не потребует серьезного переосмысления текущей таксономии» нуждается в соответствующей проверке.
 5. Термин «**персонализированный**» по отношению к биопрепаратам, действие которых направлено не на человеческие существа (персоны), а на растительно-микробные ассоциации, представляется не вполне удачным. Лучше было бы использовать, к примеру, термин «**объектно-ориентированный**» и т.п.
 6. К дискуссионной терминологической части следует добавить, что термин PGPR (на стр. 88 диссертации расшифрован как «Plant growth promoting **rhizobia**») уже занят в научной литературе ризобактериями – Plant Growth Promoting **Rhizobacteria** (Vessey J.K. *Plant Soil.* 2003. Vol. 255. P. 571-586). Таковые включают **более широкий** по срав-

нению с ризобиями круг бактерий, обитающих в прикорневой зоне (ризосфере) растений. В том числе **свободноживущих**, например, рода *Azospirillum*. Так что можно было бы посоветовать автору в случае ризобий вместо PGPR ввести в обиход более адекватную аббревиатуру, к примеру PGPRh. Хотя, согласно номенклатуре из указанной выше публикации, ризобии уже включены и в категорию Rhizobacteria, и в категорию PGPR.

7. Список **сокращений** на стр. 5 диссертации, в котором отсутствует расшифровка использованной автором аббревиатуры ВР (внехромосомные репликоны) и ряд других, следовало бы расположить в **алфавитном** порядке. Вначале русскоязычные, затем англоязычные термины.

Данные замечания имеют лишь уточняющий, технический, но не принципиальный характер, как пожелания для будущего развития этой, несомненно, актуальной темы. Они не снижают ценности полученных автором разнообразных экспериментальных данных и **не влияют** на общую **позитивную** оценку рассматриваемой диссертации.

С учетом изложенного выше можно заключить, что диссертационная работа «Генетическое маркирование клубеньковых бактерий и способы повышения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза» полностью **отвечает** требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации **соответствует** паспорту специальности 03.02.03 – «Микробиология» (биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5, 3.1 «Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова», а также оформлена, согласно приложениям №5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Считаю, что соискатель Хапчаева Софья Арсеновна **заслуживает** присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «Микробиология».

Заведующий лабораторией иммунохимии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук (ИБФРМ РАН)
доктор химических наук, 02.00.04 «Физическая химия»
профессор

С.Ю. Щеголев

410049, Саратов,
просп. Энтузиастов, дом. 13,
тел. 8-905-386-40-52,
эл. почта shegolev_s@ibppm.ru,

Подпись С.Ю. Щеголева ЗАВЕРЯЮ:
ученый секретарь ИБФРМ РАН
к.б.н.

02 декабря 2019 г.



О.Г. Селиванова