

## ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Андропова Евгения Евгеньевича на тему: «Эколого-генетические механизмы молекулярной эволюции клубеньковых бактерий, определяемой растениями-хозяевами», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по научной специальности 1.5.11. Микробиология.

Представленная к защите диссертация направлена на решение важной проблемы биологии – молекулярной эволюции клубеньковых бактерий. Возникновение в эволюции симбиотических diaзотрофов и перенос в их клетки компонентов, вовлеченных в азотфиксацию, от свободноживущих diaзотрофов привело к формированию уникальной системы – корневого клубенька, обеспечивающего бобовые растения способностью к фиксации атмосферного азота. Как отмечает автор работы во введении, фундаментальный аспект этой проблемы связан также с тем, что способные к азотфиксации бактериоиды в клубеньках можно рассматривать в качестве аналогов эукариотических органелл, однако появившихся в эволюции позднее, чем хлоропласты и митохондрии. Реконструкция эволюции азотфиксирующего симбиоза, таким образом, может расширить наши представления о механизмах органеллогенеза и позволит найти подходы к возможности конструирования подобных систем.

Особый интерес к проблеме эволюции клубеньковых бактерий на всех ее этапах связан также с тем, что одним из основных факторов, управляющих этим процессом, является растение-хозяин, причем многие эволюционные процессы протекают в соответствии с классической схемой «ген-на-ген», в которой генетические изменения в партнере-растении симбиотической системы ведут к изменениям в бактериальном партнере. Следует, однако отметить, что ризобии представляют собой свободноживущие гетеротрофные бактерии, которые только в ходе образования клубенька дифференцируются в бактериоиды, что определяет дополнительную роль эдафических факторов в процессе эволюции. Кроме того, при решении указанной проблемы было необходимо учитывать горизонтальный перенос симбиотических генов между штаммами и видами ризобий.

Представленная диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы из 124 источников. Работа содержит 20 иллюстраций и 4 таблицы. Общий объем диссертации составляет 107 страниц.

В первой главе диссертант дает характеристику основных этапов эволюции ризобий, обсуждая имеющиеся в литературе данные, в том числе собственные, и

вводит понятия «первичных» и «вторичных» ризобий: первые из которых, по мнению автора, возникли из свободноживущих азотфиксаторов путем геномных перестроек, а также рекомбинации с другими симбионтами растений, а вторые появились в результате переноса *sym*-генов ризобий в различные бактерии почв. Одним из основных положений диссертации является утверждение о том, что горизонтальный генный перенос симбиотического кластера в какой-либо из существующих видов почвенных микроорганизмов, приводящий к возникновению микроорганизма, способного к симбиотической азотфиксации, представляет собой макроэволюционное событие, результатом которого является как трансформация генома реципиента, так и занятие новым организмом новой экологической ниши и, соответственно, возникновение новых надвидовых таксонов. Далее эволюционный процесс рассматривается отдельно для дивергенции корового компонента генома, управляемого, по всей видимости, эдафическими факторами и приводящего к видообразованию и микроэволюционных процессов, обусловленных вариациями в акцессорной, симбиотической части генома. Экспериментальному исследованию этих процессов посвящены следующие две части диссертации. В первой из них основным объектом стали микросимбионты реликтового бобового растения вавиловии красивой (*Vavilovia formosa*), которые имеют ряд анцестральных черт в организации симбиотического генома, и, по мнению диссертанта, именно в анцестральных линиях бобовых поддерживаются анцестральные формы ризобий. В ходе проведенных исследований установлено, что основным симбионтом вавиловии, является вид *R. leguminosarum*, близкий к биовару *viciae*. Следует отметить, что на основе проведенного анализа автор подразделил штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* на две группы: «анцестральных» и «производных», выделенных из вавиловии, и вики и гороха соответственно. В итоге анализ штаммов ризобий, полученных из клубеньков вавиловии красивой, позволил диссертанту рассмотреть механизмы «приобретения и утраты генов» и «компактизации кластеров *sym*-генов» как ключевые в эволюции симбионтов бобовых трибы Fabeae (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*).

В третьей главе автор рассматривает роль растения-хозяина в контроле эволюции ризобий и обсуждает микроэволюционные процессы у видов *Neorhizobium galegae*, *Sinorhizobium meliloti* и *R. leguminosarum*. Диссертант в данной части затрагивает чрезвычайно важную область эволюционных исследований, связанных с действием различных типов отбора в симбиотических системах, демонстрируя высокий потенциал глубокого секвенирования

ампликонных библиотек симбиотических генов для раскрытия важных закономерностей отбора, что может рассматриваться как одно из перспективных направлений исследований в этой области. В Заключении работы автор представляет многоуровневую иерархическую классификацию эволюционных процессов у ризобий.

Таким образом в работе, основанной на исследованиях, проведенных в течение 10 лет, диссертанту удалось рассмотреть эволюционные события различного масштаба, которые в результате привели к возникновению азотфиксирующих симбиотических систем. Работа, представленная к защите, представляет собой цельное и законченное исследование, при этом открывающее весьма интересные направления для дальнейшего развития. Важной особенностью работы является использование широкого арсенала самых современных методов, включая геномное секвенирование, глубокое секвенирование ампликонных библиотек, молекулярное моделирование и докинг.

Следует отметить, что область эволюционных исследований – весьма специфическая, и эволюционные выводы всегда являются в большей или меньшей степени догадками, так как прямое наблюдение процессов, возраст которых исчисляется десятками миллионов, очевидно, невозможно. В этой связи эволюционные построения в определенной степени являются обоснованными догадками. В этом отношении важно отметить, что эволюционные схемы, предложенные автором, являются лишь одним из теоретически возможных сценариев, которых, потенциально, в почти бесконечном мире микробного разнообразия может быть множество.

У рецензента также есть несколько вопросов к диссертанту.

- 1) Предложенная в работе эволюционная схема, в которой роль «пионеров» симбиотической азотфиксации отведена роду *Bradyrhizobium*, в котором произошло формирование симбиотического кластера, в то время как представителям родов *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Neorhizobium* и др. отведена роль вторичных «реципиентов» ранее сформированного симбиотического кластера выглядит весьма правдоподобно, однако допускает и версию, в которой начальное формирование симбиотического кластера происходит в третьем, пока неизвестном участнике и независимо перенесенная в геномы предков медленнорастущих ризобий и в геномы предков быстрорастущих

ризобий. А наблюдаемые особенности организации симбиотических кластеров обусловлены особенностями биологии, а не древностью конструкций. Хотелось бы услышать комментарий Евгения Евгеньевича по данному поводу.

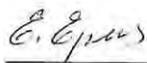
- 2) Автором был использован интересный и необычный подход, связанный с построением метадрева, группирующего не последовательности генов, а их филогении по признаку сходства топологий. В какой степени топология метадрева зависит от конкретной выборки геномов и существует ли статистическая поддержка кластеров в метадревьях?
- 3) При анализе молекулярных механизмов эволюционного прессформинга автор разработал и впервые использовал новый и весьма необычный способ «проекции» генетического разнообразия на контактную поверхность рецепторного гетеродимера с одновременным докингом Nod-фактора. При молекулярном моделировании была использована химическая структура стандартного Nod-фактора *R. leguminosarum* докинг которого был выполнен к рецепторному гетеродимеру, соответствующему двум мажорным аллелям, выявленным в некоторой природной популяции (при этом не обязательно принадлежащим одному растительному генотипу). Есть ли по мнению автора основания полагать, что подобная тройная «химера» может встречаться в природе?
- 4) Наконец, при обсуждении механизмов отбора, вполне ли уместно говорить о дизруптивном отборе в том случае, когда растения клевера и вики отбирают штаммы свои собственных биоваров из почвенной популяции ризобий?

В целом, впечатление о рецензируемой диссертации очень хорошее. Она выполнена на высоком международном уровне, оригинальность и достоверность полученных данных, а также обоснованность сделанных в работе выводов сомнений не вызывают.

Диссертация Евгения Евгеньевича Андропова на тему: «Эколого-генетические механизмы молекулярной эволюции клубеньковых бактерий, определяемой растениями-хозяевами», соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете»,

соискатель Андронов Евгений Евгеньевич заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по научной специальности 1.5.11. Микробиология. Пункты 9 и 11 указанного Порядка диссертантом не нарушены.

Член диссертационного совета,  
доктор биологических наук,  
профессор,  
профессор кафедры  
микробиологии биологического  
факультета СПбГУ



Елена Викторовна Ермилова

02.06.2022