

УТВЕРЖДАЮ:

Проректор – начальник
управления научной политики
и организации научных исследований

МГУ имени М.В.Ломоносова

А.А.Федянин



2018 г

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Азарахш Махбубех

«Изучение роли транскрипционного фактора KNOX3 в процессе органогенеза клубеньков бобовых растений», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика

Актуальность диссертации

Диссертационная работа посвящена генетическому изучению процесса органогенеза клубеньков бобовых растений. Благодаря функционированию симбиотических клубеньков, в тканях бобовых растений накапливаются азотсодержащие органические соединения, белки, обуславливающие высокую питательную ценность этих культур и их роль в севообороте для обогащения почвы азотом. В связи с этим, изучение механизмов развития клубеньков бобовых растений представляется актуальным с практической точки зрения.

Развитие азотфиксирующих клубеньков у бобовых растений при симбиозе с почвенными бактериями ризобиями – сложный процесс, который находится под контролем как растительного, так и бактериального геномов. Известно, что бактериальные Nod факторы вызывают пролиферацию клеток перицикла, дедифференциацию и пролиферацию клеток коры, что приводит к образованию примордия клубенька. В примордии клубенька у бобовых закладывается самоподдерживающаяся популяция клеток – меристема, благодаря активности которой продолжается рост клубеньков. Поэтому, процесс формирования симбиотического клубенька у бобовых растений представляет собой прекрасную модельную систему для изучения процессов формирования меристем *de novo*, дедифференциации и пролиферации клеток. В связи с этим, изучение механизмов развития клубеньков бобовых растений представляется актуальным фундаментальным исследованием генетики развития растений. Наибольшее внимание уделено изучению взаимосвязи транскрипционных факторов (ТФ) и гормонов в процессе развития клубенька, что позволило автору выявить новые молекулярно-генетические механизмы этого сложного процесса. Вышесказанное позволяет утверждать, что исследования, проведенные Азарахш Махбубех, высоко

актуальны как с точки зрения фундаментальных исследований, так и с практической точки зрения.

Структура и содержание работы

Диссертация Азарахш Махбубех изложена на 178 страницах, содержит 68 рисунков и 3 таблицы, в списке цитируемой литературы представлены 234 источников. Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения и выводов. В диссертации имеется и приложение из 19 страниц.

Во введении автор кратко описывает изучаемую проблему, обосновывает актуальность и научную новизну проведенных исследований. Обзор литературы (41 стр.) является компетентным и хорошо иллюстрированным введением в экспериментальную часть работы. Важное место в обзоре уделено роли транскрипционных факторов семейства KNOX в развитии растений в целом и в регуляции активности меристемы побега, в частности. Рассмотрено участие генов KNOX в регуляции биосинтеза цитокинина. Детально рассмотрена литература по регуляции развития симбиотических клубеньков, а также новейшая информация о молекулярных основах бобово-ризобийных взаимодействий, в том числе – и посвященная сигнальному пути цитокинина и его роли в образовании клубеньков.

Обзор заканчивается кратким заключением, в котором диссертант суммирует результаты анализа литературы и обосновывает целесообразность использования результатов молекулярно-генетических исследований поддержания меристемы побега для изучения механизмов регуляции генов биосинтеза цитокининов при образовании клубеньков. В том числе, автор высказывает предположение, что по аналогии с меристемой побега, активация биосинтеза цитокинина при образовании клубеньков может происходить за счёт действия транскрипционных факторов семейства KNOX. Проверка правильности этого предположения – одна из основных задач диссертационной работы.

В разделе «Материалы и методы» (10 страниц) Азарахш Махбубех подробно описаны методы, использованные при выполнении работы. Их разнообразие и новизна приятно удивляют и свидетельствуют о самом высоком научном уровне проведенных исследований. В работе использованы разнообразные молекулярно-генетические методы (клонирование фрагментов генов, трансформация бактерий, дрожжей и растений, ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA), метод на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR)), биохимические методы, такие как выделение и очистка белка из дрожжей, белковый электрофорез и вестерн-блота, методы микроскопии (визуализации экспрессии - GUS-окрашивание), приготовление микропрепаратов), методы культивирования растений *in vitro*, компьютерный анализ данных и статистические методы для оценки достоверности результатов. Исследование проводили с использованием в качестве модельного объекта *Medicago truncatula* (Jemalong A17). Достоверность экспериментальных данных, представленных в диссертации, подтверждена воспроизводимостью результатов в нескольких биологических и технических повторностях и доказана с применением методов математической статистики.

Раздел «Результаты и обсуждения» состоит из нескольких подразделов. Первый – посвящен анализу экспрессии генов семейства *KNOX* при клубенькообразовании. Автором проанализирована экспрессия десяти генов из семейства *KNOX*, выявленных ранее в геноме люцерны, в разные дни после инокуляции ризобиями и выявили гены *MtKNOX3*, *MtKNOX5* и *MtKNOX9*, повышающие экспрессию в ответ на инокуляцию.

Создав химерную конструкцию с репортерным геном *GUS* под промотором наиболее активно отвечающего на инокуляцию гена *MtKNOX3* (*pMtKNOX3:GUS*), Азарахш Махбубех детально изучила его экспрессию в ходе онтогенеза клубеньков и подтвердил роль гена *MtKNOX3* в развитии клубенька, начиная с самых ранних этапов.

Второй раздел посвящен анализу экспрессии генов *MtIPT* и *MtLOG*, вовлеченных в метаболизм цитокинина, при клубенькообразовании. Для этого Азарахш Махбубех провела важную биоинформатическую работу по обнаружению в геноме *Medicago truncatula* гомологов генов *IPT* арабидопсиса и лядвенца. Из 21 последовательности выбраны 6 генов *MtIPT*, являющихся наиболее близкими гомологами других видов. Выявлена и ранее не описанная уникальная группа генов *MtIPT*, близких гомологов которой не было обнаружено у арабидопсиса и лядвенца.

Анализ экспрессии всех идентифицированных генов *IPT* у люцерны на разных сроках после инокуляции позволил Азарахш Махбубех показать активацию экспрессии *MtIPT1*, *MtIPT2*, *MtIPT3*, *MtIPT5*, *MtIPT9* в ответ на инокуляцию ризобиями. Кроме того, автор проанализировала экспрессию генов, кодирующих ферменты, ответственные за образование активных форм цитокининов и показала, что при развитии клубеньков происходит активация экспрессии генов *MtLOG1*, *MtLOG2* и *MtLOG3*.

Третий раздел посвящен функциональному анализу гена *MtKNOX3*, основанному на создании и изучении трансгенных растений (корней), с сверхэкспрессией или сниженной экспрессией данного гена. Т.е. на первом этапе необходимо было создать трансгенные корни со сверхэкспрессией *MtKNOX3* и с подавлением экспрессии гена *MtKNOX3* с помощью интерференции РНК. У растений со сверхэкспрессией *MtKNOX3* в корнях было обнаружено образование клубенькоподобных структур в отсутствие инокуляции ризобиями. Эти структуры экспрессировали специфические для клубенька гены, демонстрировали повышенный уровень экспрессии гена цитокининового ответа *MtRR4*, а также генов *MtLOG2* и *MtIPT3*. Таким образом, диссертантом было получено первое свидетельство об активации цитокининового ответа и уровня активных форм цитокинина при сверхэкспрессии *MtKNOX3*.

Дополнительным подтверждением выдвинутой гипотезы о связи уровня цитокинина с уровнем экспрессии *MtKNOX3* явились результаты изучения трансгенных клубеньков со сниженной экспрессией гена *MtKNOX3*. Было показано статистически значимое уменьшение экспрессии генов *MtIPT3*, *MtIPT5*, *MtLOG2* и *MtRR4*, что подтверждает гипотезу Азарахш Махбубех об участии *MtKNOX3* в активации экспрессии генов метаболизма цитокинина в ходе развития симбиотических клубеньков.

Более того, диссертанту удалось показать, что *MtIPT3*, *MtIPT5*, *MtLOG2* и *MtLO12* являются прямыми мишенями *MtKNOX3*, изучив непосредственное связывание ТФ *MtKNOX3* с регуляторными последовательностями этих предполагаемых генов-мишеней. Для выполнения этих задач был осуществлен биоинформатический поиск цис-элементов в

генах-мишенях, проведена большая работа по клонированию в экспрессионных дрожжевых векторах ДНК-связывающего гомеодомена гена *MtKNOX3*. Для проверки взаимодействия гомеодомена гена *MtKNOX3* с предполагаемыми последовательностями-мишенями использовали два метода: EMSA и SPR, которые полностью подтвердили предположение о прямой регуляции. Суммируя результаты вышеупомянутых нескольких разделов диссертации, можно утверждать, что гипотеза о сходных генетических механизмах регуляции генов биосинтеза цитокинина в клубеньках и апикальной меристеме побега полностью подтверждена автором. Впервые в мире получены убедительные доказательства о том, что ген *MtKNOX3* может активировать продукцию цитокинина при развитии азотфиксирующих клубеньков за счет активации экспрессии генов биосинтеза цитокинина, подобно тому, как это описано для ТФ STM и KNAT1 в апикальной меристеме побега.

Результаты этих приоритетных данных опубликованы в ведущих мировых журналах и уже цитируются. Однако, диссертант не ограничился полученными очень значимыми результатами, а пошел еще дальше, вглубь сложных и очень мало изученных вопросов обмена сигналами, необходимыми для клубенькообразования, между корнем и побегом. В изучении этих сложных вопросов Азарахш Махбубех опиралась на данные собственных исследований, а также данные, полученные на лядвенце. И при выполнении этих исследований диссертанту пришлось вновь искать в геноме люцерны гены, взаимодействующие с *MtKNOX3* среди неаннотированных генов семейства *CLE*. Эти исследования позволили обнаружить ряд новых генов *CLE*, участие которых в клубенькообразовании не было показано ранее. Участие этих генов в авторегуляции клубенькообразования подтверждалась при изучении их экспрессии в трансгенных корнях с подавлением экспрессии *MtKNOX3*.

Подключив к исследованиям суперклубенькообразующий мутант *sunn-3*, на котором был выполнен всеобъемлющий экспрессионный анализ, включавший изучение экспрессии разных генов *MtIPT* в листьях на разные дни после инокуляции корней ризобиями, Азарахш Махбубех убедительно показывает, что гены *MtKNOX3/5/9* участвуют в системе авторегуляции клубенькообразования и их экспрессия зависит от CLV1-подобной киназы SUNN. Интересным результатом этих исследований явилось и впервые обнаруженный у *Medicago* нитрат-индуцируемый CLE пептид, который может быть хорошим кандидатом на роль как индуцируемого ризобиями, так и нитратом CLE пептида, подавляющего клубенькообразование.

В разделе «Заключение» Азарахш Махбубех подводит итог проведенной работы и представляет новую схему участия ТФ *MtKNOX* в развитии клубеньков и в авторегуляции клубенькообразования, в которую включены гены, впервые исследованные в представленной диссертационной работе.

Научная новизна, обоснованность и достоверность научных положений

Научная новизна диссертационной работы заключается в выявлении новых генетических факторов, контролирующих развитие симбиотических клубеньков у *Medicago truncatula*, в том числе, участие транскрипционных факторов KNOX. Впервые показана активация экспрессии ряда генов семейства IPT в развивающихся клубеньках.

Впервые показана взаимосвязь между ТФ KNOX3 и активацией цитокининового ответа при развитии клубеньков. Впервые показана активация экспрессии генов KNOX в побеге в ответ на инокуляцию, что указывает на участие этих генов в системе авторегуляции клубенькообразования AON. Также показано возможное участие ТФ KNOX3 в авторегуляции клубенькообразования через влияние на экспрессию генов, кодирующих CLE-пептиды. На основе полученных данных наглядно продемонстрирована общность механизмов активации биосинтеза цитокинина в апикальной меристеме побега и клубеньках. Все представленные в работе результаты обоснованы и достоверны, поскольку получены с использованием самых современных и эффективных методов генетики и молекулярной биологии с использованием биологических повторностей и статистической обработки.

Научная и практическая ценность

Предложена новая схема, объясняющая участие ТФ KNOX в клубенькообразовании у люцерны и их роли в биосинтезе цитокинина. Результаты работы расширили понимание роли транскрипционных факторов KNOX в развитии растений и, в частности, при клубенькообразовании. Результаты данной работы могут быть использованы в материалах курсов лекций «Симбиогенетика», «Генетика развития растений» и «Актуальные проблемы биотехнологии», читаемых на кафедре генетики и биотехнологии СПбГУ, спецкурсах на кафедре генетики МГУ и других университетах России.

Недостатки работы

- 1) Из диссертации не ясно, чем отличаются две конструкции (*KNOX3i_2* и *KNOX3i_8*) для подавления гена *MtKNOX3*, почему эффективность их работы такая различная.
- 2) В ссылке на работу конкурирующей группы допущена ошибка – работа вышла из печати в 2017, а не 2016 г (Di Giacomo, et al., 2017).
- 3) Рисунок 43 на стр.107 (Сенсограммы, показывающие взаимодействие гомеодомена *MtKNOX3* с регуляторными последовательностями генов-мишеней) явно требует дополнительных пояснений хотя бы к цветовой гамме.
- 4) Не всегда ясно, сколько биологических повторностей объединяют графики, отражающие результаты экспрессии генов, хотя в разделе «Методы» сообщается о трех независимых биологических повторностях (см., например, рис.44, стр.110).
- 5) Не слишком удачным применительно к трансгенным корням с суперэкспрессией *MtKNOX3* выглядит термин «спонтанные клубеньки».

Заключение по работе

В заключении следует отметить, что сделанные замечания не снижают научной и практической ценности проделанной работы. Автором проведена большая квалифицированная работа по изучению клубенькообразованию у *Medicago truncatula*. Все представленные в работе результаты обладают высокой степенью научной новизны; достоверность результатов, а также обоснованность выводов работы, не вызывают сомнения. Особо отметим, что исследования по близкой теме активно ведутся и зарубежом. Тем не менее, Азарахш Махбубех сумела опередить научную группу из итальянских и французских исследователей на целых 2 года (Di Giacomo, et al., 2017),

опубликовав приоритетные данные о роли генов *MtKNOX* в образовании клубеньков у люцерны в 2015 г (Azarakhsh et al., 2015).

Все основные результаты работы опубликованы (5 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России) и апробированы. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Несомненно, что проделанная работа представляет собой законченное научное исследование и соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям, выдвигаемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор заслуживает присвоения искомой степени по специальности 03.02.07 – генетика».

Отзыв ведущей организации заслушан и утвержден на заседании кафедры генетики биофака МГУ имени М.В.Ломоносова (протокол № 03-18 от 18.04.2018 г).

Отзыв подготовил:

Д.б.н, профессор кафедры генетики
биологического ф-та МГУ

Татьяна Анатольевна Ежова

Сведения о составителе отзыва:

Ежова Татьяна Анатольевна - доктор биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика, профессор кафедры генетики Московского государственного университета, звание – профессор.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,

Адрес: 119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1.

Тел. 8 (495)939-27-29. WWW: www.msu.ru E-mail: info@rector.msu.ru