

УТВЕРДИЛ:
Директор
ФГБУН Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук
д.б.н., профессор
Лось Дмитрий Анатольевич



(подпись)

« 6 » ноября 2019г.
(дата, печать)

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук на диссертационную работу Янины Иордановны Назаровой «Оценка потенциальных рисков использования генетически модифицированных растений для почвенной микробной системы» предоставленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 - экология (биология)

Исследование, выполненное Яниной Иордановной Назаровой, посвящено оценке потенциального экологического риска для почвенной микробной системы при выращивании трансгенных растений. В качестве модельных автором использованы растения табака (*Nicotiana tabacum* L) и томата (*Solanum lycopersicum* L.) с встроенным геном синтеза супероксиддисмутазы *Fe-SOD* из *Arabidopsis thaliana*.

К настоящему времени получены многие виды генетически модифицированных растений (ГМР), обладающие устойчивостью к воздействию различных биотических и абиотических факторов. Часть их уже внедрена в практику и выращивается во многих странах мира. Перед выпуском ГМР в природу обязательно проводится работа по оценке их биобезопасности по различным параметрам. Основной упор большинство исследователей делает на критериях и методах оценки только пищевой безопасности как самих трансгенных растений, так и продуктов, получаемых из них. Однако в связи с тем, что растения широко взаимодействуют с другими организмами биосферы, включая и почвенные микроорганизмы, играющими роль связующего звена биологического и геологического круговорота веществ на планете, имеется необходимость оценки экологических рисков возможного воздействия ГМР также и на почвенную микробиоту.

Особый интерес представляют исследования ризосферных микробных комплексов, у которых важная роль не только в процессах роста и развития растения, но и в поддержании почвенного гомеостаза, в реализации почвой своих экологических функций. Конечно, такие работы в мире проводятся, но результаты их очень неоднозначны – одни авторы показывают, что трансгенность растений не оказывает никакого эффекта на состояние микробных сообществ почвы, другие же исследователи говорят о его наличии с сильным варьированием наблюдаемых эффектов в зависимости от конкретного вида и условий выращивания растений, а также от встраиваемой генетической конструкции. Все это делает высоко актуальным исследование Янины Иордановны, посвященное проблеме оценке биобезопасности выращивания трансгенных растений в условиях открытой почвы.

В качестве микробной системы автором был выбран комплекс актиномицетов, которые играют ключевую роль в поддержании почвенного гомеостаза. Актиномицеты за счет продуцирования ряда гидролитических ферментов активно участвуют в утилизации растительных полимеров и минерализуют мономеры, тем самым создавая растениям благоприятные условия для существования в почвах. Эти бактерии, составляя огромную долю всех почвенных микроорганизмов, влияют на рост растений за счет продуцирования фитогормонов – ауксина, гиббереллинов и цитокининов. Они способствуют адаптации растений к экологическим стрессам, а также защищают растения от фитопатогенов, чем практически пользуются в сельском хозяйстве, создавая на их основе препараты от бактериальной и грибной инфекций.

Рассматриваемая диссертационная работа состоит из Введения, где сказано об актуальности работы, её научной новизне и поставлены цели и задачи исследования, Обзора литературы, Объектов и методов исследования, Экспериментальной части, состоящей из 4-х глав, Заключение, Списка сокращений и условных обозначений и Списка литературы, включающего 225 источников, из них 162 на иностранных языках.

В литературной части работы соискателем сделан широкий обзор литературных источников, где описано непрерывно увеличивающееся использование в сельском хозяйстве ГМР с различными признаками, в частности, устойчивости к насекомым и к действию гербицидов. При этом растениями производятся несвойственные им белки, которые могут быть токсичны и для нецелевых организмов – насекомых и почвенной микрофлоры. Выращивание трансгенных растений в таких случаях может создать проблему уменьшения биологического разнообразия почвенной микробиоты. В связи с

этим мировым сообществом был принят ряд законов по биобезопасности, позволяющих, выращивая ГМР, сохранять окружающую среду и здоровье людей. Для этого необходимо использовать эффективные методы мониторинга, что позволяет заранее, на этапе создания ГМР, выявлять опасные генотипы и контролировать их выпуск из лаборатории в производство.

Одним из действенных методов мониторинга является наблюдение за микробиотой почвы, в частности, за аскомицетами, изменение количественного и видового состава которых позволило бы вовремя заметить опасность и не допустить использование потенциально опасного организма. Диссертант разбирает множество работ по оценке влияния ГМ культур на почвенные микроорганизмы и взаимодействие их с растениями, особенно подчеркивая необходимость исследования ризосферы ГМР, в которой в силу изменения корневой экскреции, может обеспечиваться преимущество отдельным видам фитопатогенов или, наоборот, ингибирование развития их антагонистов. Автор подчеркивает, что во всех этих исследованиях не было выявлено заметного влияния на изменение свойств микробных сообществ, заселяющих ризосферу ГМР. Однако это не свидетельствует, что каждая вновь полученная ГМ культура не должна быть проверена на возможность её негативного влияния на почву. Обязательно должна быть сделана их экологическая оценка, а также проведено исследование их влияния на основные функции почвенного здоровья, таких как самоочищающая способность и супрессирующая активность.

Другая часть обзора литературы посвящена роли и свойствам актиномицетов, которые способствуют лучшему поглощению растениями азота, кальция, а также влиянию на рост растений продуцируемых бактериями ауксинов, а также способности минерализовать труднодоступные для растений соединения фосфора, позволяя их использовать. Кроме того, актиномицеты отличаются высокой колонизирующей способностью, устойчивостью спор к высушиванию и к действию излучений. Автор подчеркивает, что по данным современной литературы продукция актиномицетами вторичных метаболитов способствует экологической адаптации связанных с ними растений, и получение новых результатов в этой области исследований будет, несомненно, играть важную роль в практическом использовании актиномицетов в экологически безопасных технологиях аграрного производства.

Очень тщательно автор отнесся к разделу «Объекты и методы исследования». Методики описаны так, что они могут быть легко воспроизведены другими исследователями. Особенно подробно диссертант описал все методы работы с основным

объектом исследования – с комплексом актиномицетов. Здесь представлен методы определения численности бактерий и исследования таксономической принадлежности культур, где применены как визуальное определение, так и ряд молекулярно-биологических методов. Все эти использованные и описанные автором методы способствовали выполнению Яниной Иордановны Назаровой задуманной работы.

Экспериментальной раздел работы написан с отражением последовательности проведенных соискателем исследований.

С корней растений, выбранных автором для исследований, - с томата сорта Белый налив и табака сорта Самсун, изоляты штаммов стрептомицетов были выделены и охарактеризованы по их колонизирующей активности корней нетрансформированных растений картофеля. Сравнительный анализ морфометрических показателей показал, что колонизация стрептомицетами не оказала негативного влияния на рост и развитие растений *in vitro* и *ex vitro*. Соискателем также было показано, что подвергнутые инокуляции растения картофеля внешне не отличались от контрольных, т.е. эти прокариоты не оказывали негативного влияния на рост и развитие растений *in vitro*, что позволило диссертанту в дальнейшей работе активно пользоваться выделенными штаммами. Кроме того, была исследована способность этих штаммов подавлять рост тест-культур фитопатогенов, а также определена метаболическая активность исследуемых изолятов, и показано, что один из этих штаммов был способен синтезировать индолил-3-уксусную кислоту (ИУК). С использованием молекулярно-биологических методов была проведена таксономическая идентификация выделенных штаммов, что способствовало построению их филогенетических деревьев. Эти результаты позволили соискателю использовать стрептомицеты в качестве модельной группы микроорганизмов для биоиндикационных оценок в ризосфере растений семейства Solanacea.

Далее диссертантом были изучены свойства вегетативно размноженных линий выбранных ГМР со встроенным геном супероксиддисмутазы (СОД), на которых проводилось основное исследование. Было показано, что эти растения по своим антиоксидантным свойствам несколько отличались от исходных, имея более высокую суммарную активность СОД и меньшее содержание малонового диальдегида (МДА). При этом в каждой из используемых линий эти показатели численно отличались, что часто происходит при получении ГМР. Это м.б. связано как с различной экспрессией трансгена, так и с соматклональной изменчивостью, свойственной растениям семейства пасленовых при их вегетативном размножении. В ряде линий повышалось также содержание

каротиноидов, которые, как известно, способствуют большей устойчивости к стрессовым воздействиям, в частности к повышенному содержанию в почве алюминия. В этих же условиях на растениях табака, кроме того, было измерено содержание хлорофиллов *a* и *b* и оно было выше у трансформантов, что также свидетельствует об их более высокой устойчивости к стрессовым воздействиям. У семенного потомства растений томата после доказательства их трансгенности методами ПЦР, сделанному ранее в работе создателей трансгенных растений (Нодельман и др.), были определены морфометрические показатели, которые свидетельствовали, что ГМ растения фактически не отличались от исходных растений, имея небольшие генотипические различия, которые вполне вероятно будут нивелированы при дальнейшем размножении.

Охарактеризовав ГМР и бактериальные штаммы, автор изучил численность и структуру комплексов актиномицетов в ризосфере трансгенных и исходных линий растений обоих видов. Диссертантом было показано, что ризосферный комплекс ГМР отличался более широким разнообразием актиномицетов, чем ризосфера исходного сорта при сокращении долевого участия в комплексе стрептомицетов (84%), традиционно считающихся видами-убиквистами. При изучении начальных и вегетативно размноженных трансгенных растений общая заселенность актиномицетами ГМР нулевого поколения была несколько ниже, чем у исходного сорта, тогда как у второго поколения растений общая численность актиномицетов возрастала и была выше, чем у исходных нетрансформированных растений. Отличалось также и количество представителей родов, так, у ГМР увеличивалось число микромонопоровых видов. Автор отмечает, что эти различия имели генотипическую зависимость, и имелась общая тенденция, что при более низкой заселенности ризосферы трансформанта актиномицетами, как правило, за некоторыми исключениями, увеличивалось их разнообразие. Это, делает вывод автор, вполне вероятно связано с изменениями в спектре корневых выделений, а именно в сокращении доли легкогидролизуемых соединений (углеводов, белков), т.к. известно, что микромонопоры и олигоспоровые актиномицеты доминируют в почве на поздних стадиях сукцессии и способны к разложению трудно гидролизуемых соединений (целлюлозы, фенолов, фульвокислот и т.д.).

При проверке антагонистической активности изолятов стрептомицетов, выделенных из ризосферы и ризопланы изучаемых растений табака и томатов, диссертант четко показал, что у трансгенных растений повышалась частота встречаемости культур антагонистически активных в отношении одних болезнетворных бактерий и грибов, но понижалась в отношении других. Надо отметить, что эта активность была так же, как и в

других случаях зависима от генотипа. И автор работы делает очень важный для сельского хозяйства вывод, что снижение антагонистического потенциала актиномицетов на корнях генетически модифицированных растений чревато повышением заболеваемости сельскохозяйственных культур корневыми инфекциями, а также может способствовать накоплению в почве значительного инфекционного пула.

Этот вывод очень важен для коммерческого использования трансгенных растений - если применять соответствующие агротехнические приемы, то можно без опаски выращивать различные ГМР. Ведь известна поговорка: «Кто предупрежден - тот вооружен!». Это делает данную работу особенно актуальной, имеющей большое народно-хозяйственное значение. И в данном случае совершенно не важно, что эти конкретные трансгенные растения с встроенным геном синтеза супероксиддисмутазы по своим морфометрическим свойствам имели незначительные отличия от исходных растений. Важно, что они были трансгенны, следовательно, их генотип был изменен, что могло способствовать появлению каких-то новых качеств, вызывающих изменение корневой экскреции и, соответственно, изменению почвенной микробиоты. Но, как следует из данной диссертационной работы, выполненной Яниной Иордановной Назаровой, эти изменения можно нивелировать, изменяя агротехнику выращивания новых растений, имеющих важные для человека свойства.

Работа написана хорошим русским языком, легко читается, Хотя, конечно, не обошлось и без огрехов.

Очень не хватает в тексте работы схемы генетической конструкции, использованной для трансформации растений. Для общего сведения надо было бы её дать. В тексте также нет рисунков с электрофорезами ПЦР, можно было бы дать ссылку на другого автора. Нигде не дано доказательство экспрессии, хотя бы на уровне матричных РНК.

Существуют разночтения и разность написания обозначений генов – то маленькие, то большие буквы. Надо было бы точнее выверить всё. Кроме того, читателя работы раздражает неоднородность написания аббревиатур, то они даются русскими буквами, то латинскими. Название семейства пишется Solanacea, а не Solonacea (стр.71).

Стр.73-74 – То, что накопление МДА у трансгенных растений, высаженных в почву, меньше, чем у нетрансформированных, не говорит о функциональной активности гетерологичного гена. Если бы на эти растения подействовали каким-либо стрессовым фактором (свет, тяжелые металлы, засуха, холод и т.д.) и была бы разница в накоплении МДА, можно было бы сказать о функциональной его активности. Еще одно объяснение –

у томатов, как у всех пасленовых, очень большая соматическая изменчивость, особенно у семенного поколения. Если нет разницы по морфометрическим показателям, то наверняка есть разница в биохимии.

На Рис.8 нет обозначений 1,2,3., на Рис. 11 не указана ошибка

Очень длинные выводы, частично повторяющие текст, изложенный в самой диссертации.

Однако сделанные замечания несколько не умаляют ценности этой работы. Яниной Иордановной Назаровой выполнено самостоятельное полноценное исследование, подробно описанное в диссертационной работе. Выводы отражают полученные результаты и соответствуют поставленным задачам работы и её цели. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. По теме диссертации автором опубликовано в научных журналах, входящих в перечень ВАК РФ, 5 работ.

Представленная работа полностью соответствует п.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор – Назарова Янина Иордановна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биология).

Отзыв обсужден и единогласно одобрен на заседании расширенного семинара лаборатории транспорта ионов и солеустойчивости и групп функциональной геномики и специализированного метаболизма корней
Протокол № 1 от «5» ноября 2019 г.
кандидат биологических наук (03.00.12. физиология растений), старший научный сотрудник лаборатории транспорта ионов и солеустойчивости

Галина Николаевна Ралдугина

Название организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук
Адрес: 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35
Тел. +7(499)6785302
E-mail: raldugina42@mail.ru

П ДИРЕКТОР
ЗАВЕРШЕНО
ЗАВ. ОТД. КАДРОВ
И.И. Ралдугина
И.И. Ралдугина
И.И. Ралдугина