

## ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию **Цыгановой Анны Викторовны** «Симбиотический интерфейс в развитии клубеньков Бобовых», представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений

Формирование единой симбиотической системы из растительного организма и бактерий, способных фиксировать атмосферный азот, - процесс, который привлекает внимание исследователей на протяжении столетий. При этом несомненна возрастающая актуальность его изучения. Она связана как с использованием этой «раскрученной» модельной системы для понимания фундаментальных принципов взаимодействия растений и микроорганизмов, так и с необходимостью установления конкретики механизмов трансформации неорганического компонента биосферы в органический. Важнейшим аргументом в определении актуальности исследований в этой области исследований служит их необходимость для реализации практических задач сельского хозяйства, связанных со снижением потребности в азотных удобрениях и повышением «белковости» продукции растениеводства.

Последние десятилетия отмечены бурным развитием новых методических подходов в биологии, в целом, и в анализируемой области, в частности. Различные «омиксные» исследования, формируя масштабную и объективную картину изменений, происходящих в ходе реализации различных процессов, позволили существенно продвинуться и в понимании событий, обеспечивающих прохождение различных стадий взаимодействия растений и ризобий, выявить ряд важных молекулярных игроков. Дополнительный инструментарий сформировался благодаря получению многочисленных мутантов, имеющих охарактеризованные фенотипы с модификацией различных этапов развития клубенька. Вместе с тем остаются слабо охарактеризованными процессы, происходящие в клеточной стенке – важнейшем компартменте растительной клетки и ключевом компоненте интерфейса между клетками растений и бактерий, который претерпевает, судя по морфологии различных структур, создаваемых на разных стадиях формирования и функционирования азот-фиксирующих клубеньков, существенные и необычные видоизменения. Недостаток сведений о процессах в клеточной стенке, происходящих при взаимодействии с ризобиями, объясняется сложностью организации этой многокомпонентной структуры и сопряженными трудностями в её характеристике, а также все ещё существующей недооцененностью клеточной стенки как компартмента, выполняющего многочисленные функции и непосредственно диктующего многие события морфогенеза и сигналинга в растении. Поэтому диссертационная работа А.В. Цыгановой, направленная на изучение событий, происходящих в клеточной стенке, и факторов, на них влияющих, в ходе развития бобово-ризобиального симбиоза, несомненно актуальна.

Диссертация содержит впечатляющий объём фактического материала, при этом очевидно, что значительная его часть остается «за кадром». Работа почти полностью основана на использовании методов микроскопии, в первую очередь иммунолокализации различных эпитопов на уровне флуоресцентной и электронной микроскопии. Приведены данные, полученные с использованием большого набора различных антител, специфичных к эпитопам полисахаридов, гликопротеинов, растительных гормонов и ряда других «адресатов». Всё это проанализировано на разных стадиях взаимодействия ризобий и растения. При исследовании характера метилирования гомогалактуронана оценен также уровень экспрессии генов пектинметилэстераз. Следует отметить, что исследование динамики клеточной стенки в ходе различных физиологических процессов сложно, особенно для локально реализуемых процессов, и набор применимых подходов крайне лимитирован. В этих условиях, анализ с использованием иммуноцитохимии - наиболее адекватный подход, тем более, если он осуществлён в таком объёме и с таким качеством полученных иллюстраций, как в оппонируемой работе, а выводы делаются с учётом ограничений, диктуемых параметрами использованных методик.

Особую ценность работе придаёт количественная оценка распределения метки на электрономикроскопических снимках. Числовые выражения, сопровождаемые статистической обработкой, существенно обогащают картину, сформированную на основе микрофотографий, и делают её более убедительной. Такая количественная оценка осуществлена для характеристики распределения некоторых пектинов, арабиногалактановых белков, глутатиона, гибберелинов. Безусловный интерес также представляют данные, полученные при анализе различных симбиотических мутантов, и их сравнении с растениями исходного генотипа, а также результаты анализа распределения сложных гликанов в растущей инфекционной нити. При внешнем сходстве с апикальным ростом таких структур как пыльцевая трубка и корневой волосок, удлинение инфекционной нити имеет, как справедливо отмечается в диссертации, другие механизмы и движущие силы. Среди внутренних компонентов инфекционной нити и симбиосом хорошо выявляются арабиногалактановые белки. Некоторые их эпитопы охарактеризованы как маркёры дифференцировки симбиосомных мембран.

Завершается работа общим обсуждением результатов (заключением), выводами и списком литературы. Несомненным украшением работы служит заключительная схема, суммирующая результаты.

Как и практически любая сложная, значительная по объёму работа, диссертация не свободна от недостатков. Часть из них связана, вероятно, с необходимостью компактного изложения диссертации. Например, для знакомства с методологией и методами диссертационного исследования соискатель отсылает к статьям, опубликованным по результатам работы (стр. 13-14). В целом, это допустимо, но мне кажется, несколько обеднило работу. Так, одним из существенных элементов научной новизны справедливо

обозначено, что «разработана методология использования иммуноцитохимического анализа для идентификации и локализации компонентов симбиотического интерфейса и позиционной информации во время инфекционного процесса». Было бы логично изложить в тексте диссертации эту методологию в концентрированном виде.

Более того, в ряде случаев отсутствуют даже базовые индикаторы использованных методов, что затрудняет восприятие изложения результатов. Так, например, совершенно неясно, каким образом оценивался относительный уровень экспрессии генов пектинметилэстераз, и результаты, представленные на рисунках 1 и 2, вызывают массу вопросов. При этом ссылки на работы, где эти данные опубликованы соискателем, не обозначены.

К числу недочётов диссертации следует отнести недостаточно обоснованное использование терминов, характеризующих параметры механических свойств клеточной стенки. Так, термин «жесткость» фигурирует в нескольких выводах и положениях, выносимых на защиту. При этом никаких анализов этой физической величины, выражаемой в конкретных физических единицах, в работе не осуществлялось.

Не всегда чётко прослеживается логика развития исследования, в том числе, логика выбора объектов для анализа, включая разнообразных мутантов. Неясно также, почему для сопряжения с данными по иммунолокализации эпитопов гомогалактуронана с различной степенью метилирования анализировали уровень экспрессии только генов пектинметилтрансфераз: для формирования адекватной картины необходимо было оценить и уровень экспрессии гомогалактуронансинтаз, пектинметилтрансфераз, полигалактуроноаз и пектатлиаз.

В работе имеется ряд технических погрешностей. Не всегда удачно оформлены рисунки и сформулированы подписи к ним. В особенности это касается рисунков 1 и 2.

Тем не менее, характеризуя в целом диссертационное исследование, следует отметить, что экспериментальная работа выполнена на высоком методическом и техническом уровне. Несомненны актуальность и новизна работы. Получен обширный объём уникальных данных о модификации стенки растительной клетки на разных стадиях формирования бобово-ризобиального симбиоза и в проанализированной коллекции симбиотических мутантов. Сформулированы весомые положения, выносимые на защиту. Выводы, сделанные автором, обоснованы, вытекают из основных разделов диссертации и соответствуют поставленным задачам.

Работа Анны Викторовны Цыгановой обстоятельно апробирована на многочисленных конференциях в России и за рубежом. В списке публикаций по теме диссертации представлены 25 статей, значительная часть которых опубликована в престижных журналах первого квартала. Более чем в половине статей А.В. Цыганова является первым автором.

С учетом всего вышесказанного полагаю:

Содержание диссертации Цыгановой Анны Викторовны на тему «Симбиотический интерфейс в развитии клубеньков Бобовых» соответствует специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений. Диссертация является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение. Нарушений пунктов 9, 11 Порядка присуждения Санкт-Петербургским государственным университетом ученой степени кандидата наук, ученой степени доктора наук соискателем ученой степени мною не установлено. Диссертация соответствует критериям, которым должна отвечать диссертация на соискание ученой степени доктора наук, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете» и рекомендована к защите в СПбГУ.

Член диссертационного совета

доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, зав. отделом физиологии и молекулярной биологии растений Казанского института биохимии и биофизики – структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук»

Горшкова Татьяна Анатольевна

19.11.2024

Г.н.с., д.б.н., проф. Горшкова Татьяна Анатольевна

КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, 420111 г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31. 8-(917) 273-95-57.

E-mail: [gorshkova@kibb.knc.ru](mailto:gorshkova@kibb.knc.ru)

Подпись Горшковой Т.А. заверяю:

