

ОТЗЫВ

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

Возникновение в процессе эволюции симбиотических сообществ между бобовыми растениями и свободноживущими в почве бактериями порядка *Rhizobiales* привело к формированию уникальной системы — корневого клубенька, в котором происходит фиксация атмосферного азота с образованием доступных растениям органических азотсодержащих соединений. Представленная к защите диссертация направлена на решение важной проблемы биологии – изучению компонентного состава симбиотического интерфейса и его изменений в процессе развития азотфиксирующих клубеньков Бобовых. Как отмечает автор работы во введении, в случае бобово-ризобияльного симбиоза взаимодействия молекул в симбиотическом интерфейсе сложны, многогранны и в большинстве своем малоизучены. Развитие бактерий внутри растительных клеток является основным условием «эффективного» симбиоза и самым уникальным свойством этой мутуалистической ассоциации. Успешный процесс колонизации зависит от подавления защитных реакций растения-хозяина, которые могут остановить развитие инфекции, ингибируя рост инфекционных нитей, выход ризобий в цитоплазму растительной клетки или вызвать раннее старение симбиосом. В этой связи актуальность представленной диссертационной работы, посвященной изучению симбиотического интерфейса на основных этапах развития клубеньков бобовых растений не вызывает сомнений.

Известно, что процессом инфицирования управляет строго регулируемая генетическая программа, которая обеспечивает контролируемую колонизацию растительных клеток и последовательную модификацию взаимодействия между растениями и ризобиями. Для развития клубеньков требуется синтез и распознавание сигнальных и иных молекул, которые продуцируются двумя организмами, причем обмен веществ между растением и ризобиями обеспечивается обширной контактной поверхностью между хозяином и микросимбионтом – симбиотическим интерфейсом. Таким образом, определение компонентного состава симбиотического интерфейса и его изменений в процессе развития азотфиксирующих клубеньков Бобовых, может расширить наши представления о молекулярно-клеточных механизмах бобово-ризобияльного симбиоза и позволит найти подходы к управлению этими уникальными симбиотическими системами.

Представленная диссертация содержит введение, четыре главы, заключение, выводы, приложение А. Список научных работ соискателя насчитывает 25 работ и список литературных источников включает 198 наименований. Работа содержит 10 таблиц, 4 рисунка в тексте и 29 рисунков в Приложении А. Общий объем диссертации составляет 135 страниц.

В первой главе диссертант дает глубокую оценку модификациям клеточных стенок и стенок инфекционных нитей в клубеньках Бобовых разных типов. Изучение биохимического состава клеточных стенок с использованием молекулярно-генетических и иммунохимических подходов, позволило автору обосновать представление о динамичности структуры клеточной стенки в симбиотических клубеньках, охарактеризовать ее компоненты и их модификацию в зависимости от стадии развития и пространственного расположения клеток и инфекционных структур. Впервые с использованием иммуноцитохимического анализа проведено всестороннее изучение компонентов симбиотического интерфейса в азотфиксирующих клубеньках нескольких видов Бобовых, формирующих клубеньки разных типов. Автором показано наличие высокометилэтерифицированного гомогалактуронана и рамногалактуронана I (его полисахаридного остова и арабинановой боковой цепи) во всех клеточных стенках и стенках инфекционных нитей у всех изученных видов Бобовых. К видоспецифическим особенностям отнесено отсутствие фукозилированного ксилоглюкана в клеточных стенках в клубеньках *P. sativum*, его наличие в клеточных стенках неинфицированных клеток в клубеньках *M. truncatula* и во всех клеточных стенках в клубеньках *V. formosa*. Впервые выявлены видоспецифичные маркеры созревания симбиосомных мембран в клубеньках *P. sativum* – арабиноагалактановые белки с гликозилфосфатидилинозитоловым якорем. Одним из основных положений диссертации является утверждение о том, что развитие симбиотического клубенька бобовых растений сопровождается онтогенетическими модификациями симбиотического интерфейса: в клеточных стенках изменяется степень метилирования молекул гомогалактуронанов, модифицируются боковые цепи и блочный характер остова рамногалактуронана I, изменяется состав гемицеллюлоз.

В главе 2 изложены современные научные представления о развитии защитных реакций при восприятии ризобий как патогенов в мутантах гороха. В результате проведенных исследований автором установлены разнообразные защитные реакции в клубеньках мутантов *P. sativum*: усиление жесткости стенки инфекционной нити, отложение каллозы и суберина в клеточных стенках и стенках инфекционных нитей, отложение материала клеточной стенки вокруг вакуоли, инкапсуляция дегенерирующих бактериоидов пектинами, дегенерация бактерий внутри инфекционных нитей, развитие окислительного стресса и преждевременное старение симбиотических

структур. Также в клубеньках мутанта *P. sativum* SGEFix⁻ 1 (*Pssym40-1*) обнаружено избыточное накопление перекиси водорода в инфекционных нитях, инфекционных каплях и ювенильных бактериоидах на фоне повышения уровня экспрессии гена *Ps7RA84*, кодирующего пероксидазу, что указывает на развитие окислительного стресса, вызывающего формирование аномальных бактериоидов в цитоплазме инфицированных клеток клубеньков и их раннее старение.

В третьей главе диссертант рассматривает роль межклеточного матрикса и матрикса внутри просвета инфекционной нити, содержащих специфические гликопротеины, как основной внеклеточной среды обитания ризобий. Установлено, что в симбиотических клубеньках Бобовых синтезируется тканеспецифичный набор арабиногалактановых белков (АГБ), являющихся сложными кополимерами арабиногалактанпротеин-экстенсина (АГБ-Э). С использованием мутантов гороха проведен морфометрический анализ локализации и распределения АГБ-Э, несущих метку MAC204 и MAC236, который показал, что у мутанта *P. sativum* с гипертрофированными инфекционными каплями SGEFix⁻1 (*Pssym40-1*) наблюдалось увеличенное количество метки в инфекционных каплях, а у мутанта с «запертыми» инфекционными нитями и отсутствием выхода ризобий в цитоплазму растительной клетки SGEFix⁻2 (*Pssym33-3*) – в инфекционных нитях. У двойного мутанта RBT3 (*Pssym33-3*, *Pssym40-1*) количество метки оказалось промежуточным между родительскими мутантными генотипами. По мнению автора, гены *PsSym33* и *PsSym40* могут участвовать в независимых путях, задействованных в формировании матрикса инфекционных нитей и инфекционных капель.

В главе 4 экспериментально доказано, что антиоксидантная система (на примере глутатиона) и фитогормоны (на примере транс-зеатина рибозида и гибберелловой кислоты ГА₃) участвуют в функционировании и модификации симбиотического интерфейса симбиосом в клубеньках *P. sativum* при эффективных и неэффективных взаимодействиях. Высокую научную значимость имеет предложенная автором модель функционирования инфекционной нити в недетерминированных клубеньках Бобовых (на примере *P. sativum*), которая определяет участие различных компонентов симбиотического интерфейса в построении стенки и матрикса инфекционной нити, в формировании инфекционной капли и последующем выходе бактерий в цитоплазму растительной клетки.

Диссертация Цыгановой А.В. является цельной научной работой с четко поставленными целью и задачами. Основные положения диссертации и выводы, основываются на значительном объеме проведенных молекулярно-генетических и микроскопических исследований, включая тонкие способы визуализации объектов с помощью флуоресцентной, иммуноэлектронной и цитохимической локализации,

конфокально-лазерной микроскопии и трансмиссионной электронной микроскопии. Результаты исследований опубликованы в ведущих российских и высокорейтинговых международных изданиях, что подтверждает их достоверность (представлен список 25 работ, опубликованных по теме диссертации). Материал изложен грамотно и последовательно, снабжен информативными иллюстрациями. Выносимые на защиту положения диссертации достаточно подробно обсуждены в публикациях, а также на международных и российских конференциях. Таким образом, степень обоснованности положений и заключения, сформулированных в диссертации, не вызывают сомнений.

В качестве фундаментального аспекта работы следует отметить, что полученные в диссертационной работе результаты и выводы расширяют представление о молекулярно-клеточных процессах формирования бобово-ризобиального симбиоза. Прикладной аспект работы может быть связан с возможностью использования выявленных научных закономерностей для повышения эффективности природных и искусственных симбиотических азотфиксирующих систем не только с участием бобовых, но и других культурных растений.

У рецензента есть также несколько вопросов к диссертанту:

1) При расшифровке основных положений модели роста и развития бобово-ризобиального симбиотического интерфейса в инфекционных нитях Бобовых (на примере *Pisum sativum*) на стр. 69 в пункте (5) автор указывает на то, что «...Гликопротеины, белки и полисахариды влияют на биофизические свойства стенки и матрикса в просвете инфекционной нити». Хотелось бы уточнить, какие конкретно биофизические свойства изменяются и в чем биологический смысл таких изменений?

2) В своей работе автор использует разные штаммы ризобактерий: *Rhizobium le guminosarum bv. viciae* CIAM 1026 как основной. В гистологических исследованиях клубеньков был использован штамм VF39 *gusA (const.)*, а в иммуноцитохимических экспериментах – штамм 3841. Хотелось бы уточнить, чем обусловлен выбор штаммов в каждом конкретном случае и различаются ли они по своей колонизирующей активности?

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 в области расшифровки симбиотических взаимодействий в развитии клубеньков Бобовых.

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 должны отвечать диссертации 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,
член-корр. НАН Беларуси, доцент,
заведующий лабораторией прикладной
биофизики и биохимии ГНУ «Институт
биофизики и клеточной инженерии
НАН Беларуси»

Кабашникова Л.Ф.

15.11.2024 г.

