

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

**ИНСТИТУТ
ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

им. К.А. Тимирязева

Российской академии наук

127276, Москва, И-276, Ботаническая ул., 35

Тел. (499) 678-54-00, Факс(499) 678-54-20

E-mail: ifr@ippras.ru

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИФР

им.К.А.Тимирязева

д.б.н.,

чл.корр. РАН Д.А.Лось

19 сентября 2024 г

Отзыв ведущей организации

на диссертационную работу **Цыгановой Анны Викторовны «Симбиотический интерфейс в развитии клубеньков Бобовых»**, представленную на соскание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертация А.В.Цыгановой посвящена проблеме оптимизации азотфиксирующего симбиоза. Фиксированный азот является лимитирующим фактором роста и продуктивности растений, вследствие чего в агрокультуре используются минеральные азотные удобрения.

Бобовые растения обладают способностью к использованию почв, бедных азотом, благодаря процессу азотфиксирующего симбиоза. Бактерии семейства *Rhizobiaceae* образуют внутриклеточные колонии в клетках новообразованного на корне растения-хозяина органа, корневого клубенька, где создаются условия для поддержания процесса азотфиксации. Ризобии способны к азотфиксации только в случае нахождения в цитоплазме клетки-хозяина и формирования специфического внутриклеточного мембранного интерфейса между бактерией и клеткой-хозяином который обеспечивает поддержание колонии бактерий и транспорт аммиака в цитоплазму клетки-хозяина.

Процесс азотфиксации является экологически чистым, но, в связи с его недостаточной эффективностью, промышленное выращивание бобовых на симбиотическом азоте не практикуется. Диссертация А.В.Цыгановой, посвященная исследованию интерфейса между внутриклеточной бактерией и цитоплазмой клетки-хозяина, а также между инфицированной клеткой и апопластом, является очень актуальной и дает перспективы для биотехнологических работ по увеличению эффективности симбиоза.

Проведенные А.В.Цыгановой исследования компонентного состава клеточной стенки и его модификации в процессе развития симбиоза, выполненные с использованием иммуноцитохимического анализа, соответствуют уровню европейских и мировых работ в этой области науки.

Структура диссертационной работы

Диссертационная работа Цыгановой Анны Викторовны выполнена по классическому плану и включает следующие разделы: Введение, в котором также сформулированы цели и задачи исследования, Научная новизна, Теоретическое и практическое значение, Степень достоверности и апробация результатов, Предложения, вынесенные на защиту, Основные научные результаты, Результаты и обсуждение исследований, изложенные в четырех главах, Заключение, Выводы, список основных работ по теме диссертации, включающий 25 ссылок, список литературы, содержащий 198 ссылок на иностранные и отечественные источники, и на работы А.В.Цыгановой и ее коллег, и Приложения, содержащего цитологические данные.

Обоснование проведенной работы и целей исследований в полной мере соответствует современному состоянию данной области науки и отражает полученные результаты. Обзор литературы включает ссылки как на классические работы в области симбиоза, так и на новые обзоры и разработки последних лет.

Новизна проведенных исследований и полученных выводов

А.В.Цыгановой было показано значение модификации клеточной стенки и мембранного интерфейса в онтогенезе инфицированных клеток, наличии высокометилэтерифицированного гомогалактуронана и рамногалактуронана I во всех клеточных стенках и стенках инфекционных нитей, а также наличия и локализации арабинановых эпитопов на симбиосомной мембране, в зависимости от ее зрелости. А.В.Цыгановой были получены новые данные по распределению компонентов клеточной стенки: рамногалактуронана I и ксилогалактуронана, локализации Арабиногалактанпротеин-экстензинов (АГБ-Э) в клубеньках двух видов бобовых: гороха посевного (*Pisum sativum*), и люцерны усеченной (*Medicago truncatula*) и проведено сравнение распределения этих компонентов клеточной стенки в клубеньках эффективных и неэффективных по азотфиксации генотипов бобовых растений.

Выявлены маркеры дифференцировки симбиосом в нескольких видах бобовых. Так арабинаны были ассоциированы с ювенильными и малодифференцированными симбиосомами в клубеньках *Pisum sativum*, *Medicago truncatula*, *Galega orientalis* и *Glycine max*, а арабиногалактановые белки с гликозилфосфатидилинозитоловым якорем ассоциировались со зрелыми симбиосомами в клубеньках *P. sativum*.

Исследование мутантов пути факторов клубенькообразования по ортологичным генам гороха и люцерны усеченной, позволили выявить проявление защитных реакций, выявленное по накоплению метилэтерифицированного гомогалактуронана, а также отложениям каллозы. Впервые показано участие активных форм кислорода, антиоксидантной системы (глутатиона) и фитогормонов в развитии и модификации симбиотического интерфейса в клубеньках гороха при эффективном и неэффективном симбиозе. Показано также изменение интерфейса в процессе индукции защитных реакций. А.В.Цыгановой разработана методология использования иммуноцитохимического анализа для идентификации и локализации ряда компонентов клеточных стенок в корневом клубеньке. Выявлена связь между этапами развития симбиосомной мембраны и локализацией арабиногалактановых белков.

В работе А.В.Цыгановой было показано усиление ригидности стенки инфекционной нити при накоплении низко метилэтерифицированного гомогалактуронана у мутантов *P. sativum* и *M. truncatula*, характеризующихся неспособностью выхода бактерий из инфекционных нитей в цитоплазму клетки-хозяина. Защитная реакция растения-хозяина была выражена в аккумуляции каллозы и накоплении дезэтерифицированного гомогалактуронана вокруг дегенерирующих бактериоидов у

мутанта *P. sativum* RisFixV (*sym42*). Также было отмечено накопление рамногалактуронана I, высоко метилэтерифицированного гомогалактуронана и суберина вокруг вакуоли у мутанта *P. sativum* SGEFix-2 (*sym33-3*), что указывает на ранее неизвестную роль этих компонентов клеточной стенки в процессах прекращения симбиоза.

Теоретическое и практическое значение

Проведенные А.В.Цыгановой исследования показали динамичность состава симбиотического интерфейса, который включает не только симбиосомную мембрану, но и стенку инфицированной клетки, а также выявили модификации, отражающие этап онтогенеза симбиоза и эффективность симбиотических отношений. Защитные механизмы при неэффективном симбиозе, описанные А.В.Цыгановой, могут стать теоретическими основами для повышения эффективности растительно-микробного симбиоза методами направленной селекции или мутагенеза. Результаты, изложенные в диссертации, могут быть использованы в курсах лекций по физиологии растений и микробиологии.

Кроме этого, следует отметить объем выполненной работы и полноту цитологических данных по локализации компонентов клеточной стенки, что позволяет использовать их как справочный материал для цитологов в данной области исследований.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая достоверность полученных результатов обеспечена использованием адекватных генетических моделей, неоднократными повторностями экспериментов, использованием современного высокоточного прецизионного оборудования, проведением статистической обработки полученных результатов. Материалы диссертации были представлены на отечественных и международных конференциях, в том числе: VI съезде ОФР (2007 г. Сыктывкар), 8-й Европейской конференции по азотфиксации (2008 г., Гент, Бельгия), 11-й Европейской конференции по азотфиксации (2014 г. Тенерифе, Испания), 3-м Международном симпозиуме по сигналингу и поведению растений (2015 г. Париж, Франция), VIII съезде ОФР (2015 г. Петрозаводск), 4-м Международном симпозиуме по сигналингу и поведению растений (2016 г. Санкт-Петербург), 20-м Международном конгрессе по азотфиксации (2017 г. Гранада, Испания), I международной конференции 13 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (PLAMIC2018) (2018 г. Уфа), 13-й Европейской конференции по азотфиксации (2018 г. Стокгольм, Швеция), Международном конгрессе «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (2019 г. Санкт-Петербург), IX съезде ОФР (2019 г. Казань), II международной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (PLAMIC2020) (2020 г. Саратов), III Международной научно-практической конференции «Клеточная биология и биотехнология растений» (2022 г. Минск, Республика Беларусь), III международной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (PLAMIC2022) (2022 г. Санкт-Петербург), X съезде ОФР (2023 г. Уфа).

Работа А.В.Цыгановой является прекрасным примером детального исследования структуры, состава и модификации стенки клеток клубенька. Благодаря детальному исследованию состава и изменений компонентов клеточной стенки и матрикса инфекционных нитей в клубеньках дикого типа, а также сравнение с мутантами по симбиотической эффективности, А.В.Цыганова смогла обосновать механизмы участия компонентов клеточной стенки в поддержании или прекращении симбиоза.

Особенно интересным в работе является исследование модификации защитных механизмов в тканях корневого клубенька в ответ на инфицирование ризобиями. Высокое качество электронно-микроскопических фотографий позволяет оценить локализацию компонентов клеточных стенок по расположению и количеству метки коллоидного золота в клеточной стенке, межклеточном пространстве и матриксе инфекционных нитей. Данные, полученные А.В.Цыгановой могут быть использованы также в исследованиях в области патогенеза растений.

Данные по транспорту растительных фитогормонов, таких как ауксин, цитокинин, гибберелловая кислота в симбиосомы, и их роль в развитии симбиосомного интерфейса, полученные с использованием антител и метки коллоидным золотом, достаточно интересны, чтобы быть исследованы более глубоко. Было бы крайне полезно в дальнейшем проведение исследования экспрессии гормонов в инфицированных клетках, которое будет сопровождаться изучением распределения специфических транспортеров ауксина и белков-маркеров, отвечающих на ауксин, а также возможное маркирование цитокининовых рецепторов.

Замечания

При описании распределения H_2O_2 в корневых клубеньках, которое анализировали с использованием хлорида церия (Рисунок А.12) используется термины «отложение H_2O_2 », «динамика отложения H_2O_2 ...», в данном случае автор, видимо, имеет в виду отложение пергидроксида церия, поэтому следует заменить в описании на «отложение пергидроксида церия, которое показывает увеличение содержания H_2O_2 », поскольку молекулы H_2O_2 по своей природе откладываться не могут.

Рисунок А10, А11 Не указан флуорофор, который использован для контрастирования ядер клеток

Рисунок А 14 Уточните конфигурацию микроскопа для нейтрального красного

Рисунок А.18 Уточните конфигурацию микроскопа и цвета флуорофоров, конъюгированных с вторичными антителами (указано коллоидное золото).

Приведенные стилистические замечания не снижают высокой оценки данной работы. Следует отметить, что работа имеет не только фундаментальное, но и практическое значение, получен большой массив данных, который может быть использован при дальнейших исследованиях.

Заключение по диссертационной работе.

Диссертационная работа Цыгановой Анны Викторовны «Симбиотический интерфейс в развитии клубеньков Бобовых», на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений, полностью отвечает требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013г., с изменениями от 11.09.2021, предъявляемыми к докторским диссертациям и является научно-квалификационной работой, посвященной актуальной проблеме оптимизации бобово-ризобиального азотфиксирующего симбиоза, а ее автор, Цыганова Анна Викторовна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук. Отзыв обсужден и одобрен на расширенном семинаре Группы растительно-микробных взаимодействий Института физиологии растений им .К.А.Тимирязева РАН от 19.09.2024

Директор Института физиологии растений им.К.А.Тимирязева РАН,
чл.-корр РАН, профессор Д.А.Лось

Зав.Группой растительно-микробных взаимодействий
ИФР им .К.А.Тимирязева РАН,
в.н.с., к.б.н. (03.0012 -Физиология и биохимия растений)
Е.Э.Федорова

19.09.2024

