

ОТЗЫВ официального оппонента
Гоголева Юрия Викторовича на диссертацию
Цыганова Виктора Евгеньевича
«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СИМБИОТИЧЕСКОГО КЛУБЕНЬКА»,
представленную на соискание ученой степени
доктора биологических наук по специальностям
03.01.05 – физиология и биохимия растений и
03.02.07 – генетика

Актуальность. Бобово-ризобиальный симбиоз является одним из важнейших для фундаментальной биологии примером растительно-микробных взаимодействий. Исследования в данном направлении вызывают большой интерес в мировом научном сообществе, что подтверждается многочисленными публикациями в престижных научных журналах, а также проведением специализированных международных научных форумов. Детальное понимание молекулярно-генетических и клеточных механизмов, лежащих в основе развития азотфиксирующего клубенька, является важным и для практики сельскохозяйственного производства. Активное использование высокоэффективных растительно-микробных систем, в том числе созданных с использованием бобово-ризобиального симбиоза, открывает широкие возможности для развития «устойчивого» экологически ориентированного земледелия, бурно развивающегося в последнее десятилетие. Поэтому не вызывает сомнений высокая актуальность представленной диссертации.

Содержание работы. Работа представлена на 509 страницах, содержит 114 рисунков и 42 таблицы, список литературы содержит 741 библиографическую ссылку на источники, из которых 20 представляют отечественные публикации. Впечатляющий объем диссертации отражает результаты исследований в течение двадцати лет. Рукопись В.Е. Цыганова построена по традиционному плану и содержит следующие разделы: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методики», «Результаты и обсуждение», «Заключение» и «Выводы».

Во Введении автор убедительно обосновывает актуальность исследований, строго формулирует цель работы и ставит необходимые для ее выполнения задачи.

Глава 1 «Обзор литературы» представляет собой исчерпывающую сводку научных источников, в которой дается детальное описание различных аспектов развития клубенька от самых ранних этапов сигнального диалога между бобовыми растениями и ризобиями, до финальной стадии старения. Большим достоинством обзора является удачная попытка

автора провести синтез как генетического, так и физиологического и структурно-цитологического подходов к описанию представляемого материала. Кроме того, в обзоре проанализированы как ранние работы по данной проблеме, так и самые последние статьи. Помимо описания собственно развития клубенька, приведены сведения о влиянии на этот процесс стрессовых факторов, таких как плотные почвы и присутствие кадмия.

В главе 2 «Материалы и методики» представлен богатый арсенал используемых в работе методов. Приведено детальное описание процедур пробоподготовки клубеньков и процесс их исследования различными способами световой, конфокальной и электронной микроскопии. Продемонстрирован так же широкий набор как классических методов генетического анализа, так и самых современных молекулярно-генетических методов. Дано подробное описание многих протоколов, позволяющее воспроизвести представленные эксперименты.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» содержит 15 разделов:

1. Выделение симбиотических мутантов;
2. Генетический анализ (гибридологический анализ, комплементационный анализ, локализация симбиотических генов на генетической карте гороха);
3. Выявление основных симбиотических локусов гороха, контролирующих ранние стадии реализации генетической программы симбиогенеза;
4. Идентификация гена гороха, ортологичного гену лядвенца *LjNIN*, являющегося первым клонированным геном бобовых растений и ключевым регулятором симбиогенеза на ранних стадиях;
5. Анализ роли арабиногалактанпротеин–экстензинов в реализации генетической подпрограммы инфекции тканей клубенька ризобиями у гороха;
6. Анализ роли пероксида водорода в реализации генетической подпрограммы инфекции тканей клубенька ризобиями у гороха;
7. Анализ роли реорганизации тубулинового цитоскелета в дифференцировке клеток симбиотических клубеньков гороха и *M. truncatula* при реализации поздних этапов генетической программы симбиогенеза;
8. Анализ роль этилена в реализации ранних и поздних этапов генетической программы симбиогенеза у гороха;
9. Анализ роли нитратов в реализации генетической программы симбиогенеза у гороха и *L. japonicus*;

10. Изучение изменений в характере экспрессии генов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* при реализации генетической подпрограммы инфекции тканей клубенька ризобиями у гороха;
11. Изучение проявления защитных реакций со стороны растения при реализации поздних этапов генетической программы симбиогенеза;
12. Изучение финальной стадии дифференцировки клубеньков — старения, завершающей реализацию генетической программы симбиогенеза;
13. Получение генетической модели для исследования влияния кадмия на развитие симбиотических клубеньков у гороха;
14. Получение трансгенных штаммов *R. leguminosarum* и изучение возможности создания и использования растительно–микробной системы для фиторемедиации почв, загрязненных кадмием;
15. Получение генетической модели для исследования влияния плотных почв на развитие корневой системы и симбиотических клубеньков у гороха.

По всем направлениям исследований были достигнуты значимые результаты. Особо следует отметить получение новых мутантов гороха по симбиотическим признакам. Это значительно расширило имеющуюся у автора генетическую коллекцию, которая использовалась при проведении данного исследования. Проведенный генетический анализ многих мутантов позволил выявить новые аллели симбиотических генов, картировать ряд симбиотических локусов на генетической карте гороха. Большим достижением явилось выявление гена гороха, ортологичного гену лядвенца японского *LjNIN*, являющегося ключевым регулятором симбиогенеза на ранних стадиях. Благодаря этому продемонстрировало возможное использование ряда модельных бобовых.

Концептуальная новизна работы заключается в том, что автором сформулировано и обосновано положение о существовании двух генетических подпрограмм симбиогенеза: 1) инфекции тканей клубенька ризобиями и 2) органогенеза клубенька; обладая относительной независимостью эти подпрограммы содержат точки их взаимного контроля. Дано не только детальное описание этих подпрограмм, но и проведено разграничение их «полномочий», а так же условий реализации.

Интересными представляются результаты по выявлению роли различных факторов, таких как повышенные концентрации пероксида водорода, этилена, нитратов в развитии клубенька. Для этого были использованы мутанты, у которых развитие симбиоза блокируется на различных стадиях.

Особого внимания заслуживает элегантное ультрацитоструктурное исследование организации тубулинового цитоскелета в клубеньках гороха и модельного бобового

люцерны слабоусеченной, которое явилось важным шагом на пути развития нового направления – сравнительной клеточной биологии бобово-ризобиального симбиоза. В этой части исследования наиболее полно проявилось виртуозное и творческое владение автором цитологическими методами. Благодаря этому впервые было показано, что выход бактерий является необходимым условием для реорганизации кортикальных микротрубочек, что сопровождается дальнейшим ростом инфицированных клеток. Сделанное наблюдение, что определенная организация эндоплазматических микротрубочек сопровождается определенным видоспецифичным порядком расположения симбиосом в инфицированной клетке дает новое представление о роли цитоскелета в бобово-ризобиальном симбиогенезе и расширяет наш взгляд на глубину эволюционных преобразований макроорганизма на пути становления этой формы растительно-микробного взаимодействия. По результатам данного раздела построена обобщающая схема организации кортикальных и эндоплазматических микротрубочек в различных гистологических зонах корня и клубенька у гороха и люцерны слабоусеченной.

Исследования нарушений симбиоза и снижения его эффективности позволили выявить строгий контроль за развитием инфекции со стороны растения и способность организма-хозяина воспринимать ризобии в качестве патогенов. Было показано, что старение симбиотического клубенька, по-видимому, является универсальной реакцией бобового растения на формирование неэффективных клубеньков.

Весьма перспективными представляются исследования, посвященные получению генетических моделей для изучения стрессовых факторов, влияющих на симбиоз: мутанта с повышенной устойчивостью к кадмию и мутанта, характеризующегося повышенной чувствительностью к плотности субстрата. Имеются основания полагать, что полученная растительно-микробная система может найти практическое применение для фиторемедиации почв загрязненных кадмием.

Полученные результаты прошли всестороннюю апробацию, полностью представлены научной общественности в печати. Материалы диссертации получили обсуждение на 60-ти международных и отечественных научных конференциях, изложены в 40 публикациях в отечественных и международных журналах, рекомендованных ВАК, включая ведущие в данной области высокорейтинговые издания, такие как *Plant Physiology*, *New Phytologist*, *Molecular-Plant Microbe Interactions*, *Annals of Botany*. Опубликованные статьи и представленный автореферат соответствуют содержанию диссертации и отражают основные результаты работы.

При чтении рукописи у оппонента возникли некоторые вопросы и замечания. Прежде всего, следует отметить, что традиционные ссылки на опечатки в данном случае

не уместны, поскольку в работе их крайне мало. Имеющиеся стилистические погрешности не влияют на качество восприятия материала. Отмечая высокое мастерство автора в приготовлении образцов методом микродиссекции следует высказать сомнения в целесообразности использования предварительной амплификации РНК и последующего анализа аРНК в кОТ-ПЦР. Подобные поэтапные амплификации не могут происходить без искажений транскрипционного профиля. С другой стороны, представленные данные о количестве собранных клеток может указывать на достаточном объеме материала для проведения прямого ПЦР-анализа. Кроме того, следует обратить внимание, что универсальные референсные гены встречаются крайне редко и обширные исследования транскрипционной активности генов интереса должны быть сопряжены с подбором и верификацией стабильности генов домашнего хозяйства в конкретных моделях и условиях эксперимента. Проводилось ли такое исследование в отношении гена *GapC1*? С учетом сказанного представляется, что обсуждение дифференциальной экспрессии в 2-3 или даже 1,5 раза (стр. 360, гены *PsCyp15a* и *PsTPP* в зонах III и IV) следует с известной долей осторожности, поскольку статистическая достоверность показана без учета этих факторов и нуждается в уточнении.

Заключение. Диссертационная работа В.Е. Цыганова «Молекулярно-генетические и клеточные механизмы дифференцировки симбиотического клубенька» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научно-методическом уровне и полностью соответствующей критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (ред. от 02.08.2016), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор Виктор Евгеньевич Цыганов заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.05 – физиология и биохимия растений и 03.02.07 – генетика.

08.06.2018

Заведующий лабораторией молекулярной биологии
Казанского института биохимии и биофизики – обособленного
структурного подразделения Федерального государственного
бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр
"Казанский научный центр Российской академии наук"
доктор биологических наук,

Ю.В. Гоголев



ЗАВЕРЯЮ
ученый секретарь
Григорьева И.Ю.

Григорьева И.Ю.