

Отзыв официального оппонента
Щеголева Сергея Юрьевича
на диссертацию
Цыганова Виктора Евгеньевича
на тему: «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

Результаты фундаментальных таксономических исследований земной биоты, отраженные в публикациях последних лет в ведущих мировых изданиях по сравнительной геномике, биоинформатике и т.п., демонстрируют подавляющий вклад прокариот в земное биоразнообразие. Указанные наблюдения касаются как культивируемых в лабораторных условиях, так и некультивируемых объектов, источником информации о жизнедеятельности которых становятся метагеномные данные. В дополнение к известным описаниям феномена сосуществования эу- и прокариот в разнообразных симбиотических системах с перераспределением между партнерами тех или иных наборов клеточных метаболизм, результаты обширных метагеномных исследований свидетельствуют о принадлежности к таким системам также и большого числа некультивируемых объектов. Это еще раз подчеркивает огромное принципиальное значение симбиозов в эволюции и существовании жизни, а также актуальность и важность их фундаментальных и прикладных исследований.

Бобово-ризобиальный симбиоз, являющийся предметом изучения в диссертационной работе В.Е. Цыганова, привлекает внимание исследователей уже более 100 лет и имеет все основания считаться одним из классических примеров растительно-микробных симбиотических взаимодействий. Выяснение их молекулярно-генетических и клеточных механизмов несомненно важно не только как источника новых знаний в области физиологии и биохимии растений и микроорганизмов, но и как основы для развития разнообразных биотехнологий, обеспечивающих повышение плодородия почв и решение актуальных задач растениеводства с экологически чистыми и оздоравливающими продуктами, защиту растений от патогенов и среды обитания человека от ксенобиотиков, получение биологически активных веществ широкого спектра действия и т.д.

Данный тип симбиоза отличается высокой степенью интегрированности партнеров, что связано, в том числе, с возникновением и закреплением в ходе эволюции специальных органов бобовых растений – клубеньков, мест скопления и функционирования почвенных азотфиксирующих бактерий рода ризобий, обеспечивающих растения азотным и минеральным питанием, другими важными физиологически активными веществами в обмен на аналогичную поддержку со стороны растительного партнера.

Однако целый ряд принципиальных вопросов, относящихся к его молекулярным и клеточным механизмам, остается до сих пор недостаточно исследованным. Это справедливо, в частности, для процессов дифференциации клеток симбиотического клубенька, создающих условия для аккумуляции в них симбиосом – специализированных ком-

партментов, заключающих в себе бактериоды, в которые ризобии дифференцируются для осуществления своих симбиотических функций. Весьма существенным аспектом подобных исследований является оценка роли разнообразных стрессовых факторов, обусловленных постоянным увеличением антропогенной нагрузки на сельскохозяйственные растения, связанной с наличием в почве тяжелых металлов, ее радиоактивным заражением, засухой, засолением и уплотненные почвы в результате использования тяжелой сельскохозяйственной техники и т.п.

Все перечисленное выше дает основания констатировать несомненную **актуальность** темы диссертации В.Е Цыганова, главной **целью** которой было «выявление молекулярно-генетических и клеточных механизмов дифференцировки симбиотического клубенька в норме и под воздействием абиотических стрессорных факторов». Для ее достижения автором решались следующие конкретные задачи:

1. Расширить коллекцию симбиотических мутантов гороха – получить новые генетические модели – для изучения симбиогенеза. Для этого получить с помощью экспериментального мутагенеза лабораторной линии гороха SGE новые симбиотические мутанты с нарушениями развития клубеньков и провести их генетический анализ.
2. Выявить основные симбиотические локусы гороха, контролирующие ранние стадии реализации генетической программы симбиогенеза.
3. Разработать принципы перехода от модельных систем к хозяйственно значимым на примере идентификации гена гороха, ортологичного гену лядвенца LjNIN, являющегося первым клонированным геном бобовых растений и ключевым регулятором симбиогенеза на ранних стадиях.
4. Изучить роль арабиногалактанпротеин-экстензинов и пероксида водорода в реализации генетической подпрограммы инфекции тканей клубенька ризобиями у гороха.
5. Изучить роль реорганизации тубулинового цитоскелета в дифференцировке клеток симбиотических клубеньков гороха и *M. truncatula* при реализации поздних этапов генетической программы симбиогенеза.
6. Изучить роль этилена в реализации ранних и поздних этапов генетической программы симбиогенеза у гороха.
7. Изучить роль нитратов в реализации генетической программы симбиогенеза у гороха и *L. jaronicus*.
8. Изучить изменения в характере экспрессии генов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* при реализации генетической подпрограммы инфекции тканей клубенька ризобиями у гороха.
9. Изучить проявления защитных реакций со стороны растения при реализации поздних этапов генетической программы симбиогенеза.
10. Изучить финальную стадию дифференцировки клубеньков – старение, завершающую реализацию генетической программы симбиогенеза.
11. Получить генетическую модель и исследовать влияние кадмия на развитие корневой системы и симбиотических клубеньков у гороха. Изучить возможности создания и использования растительно-микробной системы для фиторемедиации почв, загрязненных кадмием.
12. Получить генетическую модель и исследовать влияние плотных почв на развитие корневой системы и симбиотических клубеньков у гороха.

Одним из главных инструментов в решении перечисленных выше задач было использование и расширение имеющейся коллекции мутантов растений по симбиотическим признакам, обеспечивающих применение в исследованиях адекватных генетических моделей.

Диссертация В.Е. Цыганова написана по не вполне привычной для оппонента схеме, однако полностью **соответствующей** требованиям **пункта 5.3.2, «ГОСТ Р 7.0.11-2011. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления».** Рукопись диссертации структурирована по разделам, подразделам, пунктам и подпунктам, включает введение, три основных раздела, заключение, выводы, благодарности и список литературы, снабжена оглавлением и списком сокращений. Первый раздел представляет собой обзор литературы. Во втором разделе (названном Главой 2), дано описание материалов и методик. Полученные автором оригинальные результаты и их обсуждение представлены в разделе 3 (названном Главой 3), в котором материалы, отражающие решение поставленных автором 12 задач, распределены по 15 подразделам. Работа хорошо оформлена и включает весьма наглядный и качественный иллюстративный материал.

Диссертация изложена на 509 страницах, содержит 114 иллюстраций, 42 таблицы и 741 литературный источник, хорошо и ясно написана, прекрасно иллюстрирована. В автореферате приведены сведения об опубликованных автором с коллегами 40 печатных работах, 40 из которых – рецензируемые статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Во **введении** к диссертации дана краткая характеристика положения в отраслях знаний по теме диссертации, отмечаются нерешенные вопросы, формулируется цель и задачи исследования, указана научная новизна работы, ее теоретическое и практическое значение, приведены защищаемые положения, отмечены степень достоверности и апробация результатов.

В **разделе 1** (литературный обзор) приводятся и анализируются известные данные по генетическому контролю клеточных механизмов развития и функционирования симбиотического клубенька. Здесь автором предпринята вполне удачная по мнению оппонента попытка связать развитые в литературе представления о клеточных механизмах симбиоза со сведениями по генетическому контролю взаимодействия растений и бактерий в контексте темы и цели диссертации.

В **разделе 2** дано описание использованных материалов и методик. Растительные объекты включали 3 вида бобовых растений: посевной горох (*Pisum sativum* L.) и два модельных вида, отличающиеся относительно небольшим размером генома, разработанными протоколами их эффективной генетической трансформации, достаточно большой коллекцией мутантов – лядвенец японский (*Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen) и люцерна слабосеченная (*Medicago truncatula* Gaertn.). Со стороны клубеньковых бактериальных партнеров использованы штаммы видов *Rhizobium leguminosarum* и *Sinorhizobium meliloti*. Приведены условия выращивания растений, методики мутагенеза и отбора мутантов, методы гибридологического анализа и совместного наследования. Описаны методики прободподготовки и иммунодетектирования объектов для световой, лазерной сканирующей конфокальной и электронной микроскопии, гистохимических и цитохимических исследований, анализа развития инфекции и формирования клубеньков, экспрессии бактериальных генов. Представлены способы выделения растительной ДНК и геномной ДНК бакте-

рий, их плазмидной ДНК, эндонуклеазной рестрикции ДНК и ее лигирования, методы ПЦР в реальном времени и количественного анализа экспрессии транскрипционных репортерных генов, методы анализа экзогенных гормонов и определения их содержания, определения кадмия с применением масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой.

В 15 подразделах **раздела 3** диссертации В.Е Цыганова представлено описание и обсуждение полученных результатов решения указанных выше 12 задач исследования. **Кратко** основная суть приведенного в этом разделе весьма обширного и многогранного экспериментального материала состоит в следующем.

Была существенно расширена коллекция мутантов гороха по симбиотическим признакам, что позволило получить новые генетические модели и исследовать ряд особенностей дифференциации симбиотического клубенька. Мутанты, индуцированные на линии SGE, были отнесены к ранее описанным группам комплементации и показана принадлежность мутанта RisFixV, индуцированного на сорте Finale, к новой группе комплементации *Pssym42*, что, вероятно, приближает исследователей к получению в значительной мере исчерпывающего набора симбиотических генов гороха, определяемых методами экспериментального мутагенеза.

Анализ результатов блокирования процессов симбиоза на его ранних стадиях у ряда мутантов гороха дал автору основания предположить возможное наличие двух генетических подпрограмм развития симбиотического клубенька, предусматривающих стадии инфицирования растительной ткани и его органогенеза, с проявлениями взаимного контроля реализации данных подпрограмм.

В ходе исследований геномной синтении между горохом и лядвенцом был клонирован ген *Pssym35*, работа с которым дала весомый вклад в развитие общей методологии выявления симбиотических генов культур, важных для сельского хозяйства.

Анализ распределения арабиногалактанпротеин-экстензинов в клубеньках гороха продемонстрировал, что для нормального функционирования инфекционной нити важен механизм, обеспечивающий их направленную секрецию в просвет инфекционной нити. Установлено, что пероксид водорода, принимающий участие в защитных реакциях растения, необходим также и при созревании инфекционных нитей в ходе дифференциации клубенька.

Установленная трехмерная организация тубулинового цитоскелета и симбиотических структур в различных типах клеток клубеньков люцерны и гороха свидетельствует о решающей роли эндоплазматических микротрубочек в процессах роста и функционирования инфекционных нитей и капель. Показано, что по мере дифференциации неинфицированных и колонизированных бактериями растительных клеток кортикальные микротрубочки образуют структуру (паттерн), характерную для клеток корня из переходной зоны с поперечным расположением пучков микротрубочек относительно продольной оси клетки. Однако при выходе бактерий из инфекционных капель данная структура становилась неупорядоченной, что по мнению автора диссертации, возможно, необходимо для последующего увеличения размеров инфицированной клетки при дифференциации. Отмечены различия паттернов эндоплазматических микротрубочек вокруг симбиосом в клубеньках гороха и люцерны, отражающие разницу в структуре симбиосом для данных видов растений.

При выявлении нового чувствительного к этилену мутанта по гену *Pssym12* получены свидетельства того, что развитие клубеньков как при росте инфекционной нити в коре корня, так и при формировании клубеньковой меристемы контролируется этиленом. Кроме того, было показано, что этилен, возможно, контролирует также функционирование меристемы в зрелом клубеньке.

Анализ связанных и не связанных с симбиозом бактериальных генов продемонстрировал, что их экспрессия постепенно ослабевала в ходе дифференциации бактериоидов, за исключением симбиотических генов, регулируемых кислородом.

Установлено, что при нарушениях, сказывающихся на эффективности процессов образования симбиоза, полезные бактерии могут восприниматься растением как патогены, поскольку единичные мутации в генах гороха, контролирующих поздние стадии развития симбиоза, приводили к индукции специфических защитных реакций. Обнаружено, что в клубеньках мутантов, у которых развитие клубеньков было блокировано на различных стадиях, активировались гены, ассоциированные со старением. На этом основании автор допускает, что общей реакцией в ответ на неэффективное развитие клубенька является также раннее старение клеток.

Наконец, эксперименты с выявленными в ходе диссертационной работы мутантами SGECdt и SGEcrt позволили разработать адекватные генетические модели и на примере токсичных концентраций кадмия и плотных почв проанализировать устойчивость растительно-микробной системы к действию данных стрессовых факторов.

Сделанные автором **выводы** ясны и информативны, а **автореферат** диссертации вполне адекватен ее содержанию. **Обоснованность** научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, обеспечена надежностью и глубокой проработкой диссертантом основополагающих теоретических представлений о бобово-ризобиальном симбиозе, их убедительным развитием по итогам исследований, представленных в диссертационной работе В.Е Цыганова. **Достоверность** полученных экспериментальных данных гарантируется разнообразием использованных высокоэффективных методов исследования, их адекватностью поставленным в диссертации задачам, убедительной статистической обработкой результатов.

Описанию **научной новизны** результатов рассматриваемой диссертационной работы, изложенных выше, посвящены две страницы ее текста (стр. 24-26), на которых практически каждое предложение начинается со слова «впервые», всего 21 позиция. В несколько редуцированном варианте такое описание в автореферате составлено из 15 позиций. Оппонент заявляет о своем **согласии** с констатацией новизны, приведенной на стр. 24-26 диссертации и стр. 5-6 ее автореферата, и кратко отмечает, что эта **новизна обеспечена**, в частности: расширением коллекции симбиотических мутантов гороха; клонированием нового симбиотического гена; обнаружением двух взаимно контролируемых генетических подпрограмм развития симбиоза; характеристиками трехмерной организации тубулинового цитоскелета клубеньков гороха и люцерны; оценками роли этилена в развитии и функционировании клубеньковой меристемы; выявлением условий экспрессии связанных с симбиозом генов ризобий; демонстрацией зависимости реакции растительного партнера на взаимодействие с бактериями и его физиологического состояния от нарушений эффективности симбиоза; получением растительного мутанта с повышенной устойчивостью к кадмию; получением трансгенных штаммов ризобий, несущих гены гороха,

кодирующие металлотioneины, с оценками перспектив использования их симбиоза с устойчивым к кадмию мутантом гороха для фиторемедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами.

Очевидна также и **практическая значимость** существенного пополнения коллекции симбиотических мутантов гороха, развития методологии клонирования симбиотических генов у важных для сельского хозяйства бобовых растений на основе полученных результатов в области генетики модельных бобовых культур, использованных в диссертационной работе. Полученные сведения о молекулярно-генетических механизмах стабилизации процессов симбиоза могут быть применены для направленного создания практически значимых систем с высокоэффективными растительно-микробными взаимодействиями. Трансгенные штаммы ризобий, депонированные в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ОСХН РАН, представляют несомненный интерес для развития технологий фиторемедиации почв, загрязненных кадмием.

По итогам изучения диссертационной работы и относящихся к ней материалов у оппонента не возникло серьезных замечаний по ее существу. Однако появилось желание **по-дискутировать** с диссертантом по поводу отдельных терминов и понятий.

1. Со времен К.С. Мережковского (1905 г.) и затем Л. Маргулис (1960-е годы) термин «симбиогенез» (стр. 20, 22-24 и далее по тексту диссертации) прочно укрепился для обозначения эндосимбиотического происхождения **клеточных органелл эукариот** от первоначально ассоциированных ими клеток прокариот (бактерий и архей), точнее в результате первоначального **слияния клеток прокариот**. В англоязычной литературе – «symbiogenesis», словарный перевод которого также отражает указанную выше этимологию (www.multitran.ru/c/m.exe?CL=1&s=symbiogenesis&l1=1). Так что его заимствование для обозначения развития бобово-ризобиального симбиоза хотя и соблазнительно, но едва ли целесообразно. Приходится, видимо, признать более приемлемым в данном случае выражение «развитие симбиоза», что и делает автор, например, на стр. 63 и др.

2. В давней дискуссии по поводу термина «дифференцировка» оппонент является сторонником более благозвучного (на субъективный взгляд оппонента) термина «**дифференциация**», фонетически лучше, как кажется, соответствующего исходному латинскому «**differentia**».

3. «Осцилляции ионов кальция» (стр. 38 и далее по тексту диссертации) не вполне удачный термин, поскольку слово «осцилляции» буквально означает «колебания». Заметим, что в физике термин «осцилляция» применяется также для обозначения **превращения** одних элементарных частиц в другие. Так что правильнее было бы говорить об «осцилляции **концентрации** ионов кальция», что, собственно, и отражено в надписи на рисунке 3, стр. 39 диссертации. Поскольку это выражение в тексте диссертации встречается довольно часто, можно было бы использовать данный условный термин хотя-бы после соответствующего пояснения при его **первом** употреблении в тексте.

4. Вопреки утверждению на стр. 72 диссертации, **гелеобразное** состояние биополимерной системы **не** является «**твердым**», а отличается лишь потерей текучести с сохранением эластичности геля и возможности передвижения в нем (диффузия, электрофорез и т.п.) частиц (молекул, клеток) определенного размера, выше которого подобное перемещение становится невозможным.

Данные замечания имеют лишь уточняющий, технический, но не принципиальный

характер, не снижают ценности полученных автором многочисленных высококачественных экспериментальных и теоретических результатов и **не влияют** на общую высокую оценку рассматриваемой диссертации.

С учетом изложенного выше можно заключить, что диссертационная работа «Молекулярно-генетические и клеточные механизмы дифференцировки симбиотического клубенька» полностью **соответствует** критериям, установленным п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (ред. от 02.08.2016), как научно-квалификационная работа, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в областях физиологии, биохимии растений и генетики, существенно обогащающее представления об особенностях существования и функционировании бобово-ризобияльного симбиоза, а ее автор Виктор Евгеньевич Цыганов заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.05 – физиология и биохимия растений и 03.02.07 – генетика.

Заведующий лабораторией иммунохимии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов,
Российской академии наук (ИБФРМ РАН)
доктор химических наук,
профессор

410049, Саратов,
просп. Энтузиастов, дом. 13,
тел. 8-905-386-49-52,
эл. почта shegolev_s@ibppm.ru,

Подпись С.Ю. Щеголева ЗАВЕРЯЮ:
ученый секретарь ИБФРМ РАН
к.б.н.

29 мая 2018 г.



С.Ю. Щеголев
С.Ю. Щеголев

Селиванова

О.Г. Селиванова