

ОТЗЫВ

на диссертационную работу 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».

Диссертация посвящена актуальной теме – выяснению молекулярно-генетических и клеточных механизмов формирования симбиотического клубенька – специфического органа бобовых растений, являющегося инкубатором для симбиотических бактерий, осуществляющих фиксацию атмосферного азота – процесса, обуславливающего особую важность бобовых культур в практическом отношении.

Диссертация изложена на 509 листах и состоит из оглавления (11 страниц), списка сокращений (1 страница), введения (15 страниц), обзора литературы (138 страниц), материалов и методик (44 страницы), результатов и обсуждения (218 страниц), заключения (13 страниц), выводов (3 страницы), благодарностей (2 страницы) и списка литературы (61 страница); по одной странице отведено на посвящение и эпиграф, взятый из произведения Льва Николаевича Толстого. Пронумерованными главами являются материалы и методы (глава 2) и результаты и обсуждение (глава 3), глава 1 не обозначена, по логике соответствуя, по-видимому, обзору литературы. Помещение всех результатов и всего обсуждения в одну главу является не вполне традиционным композиционным приемом, нумерация же глав при такой организации материала несколько теряет смысл, что, впрочем, не сказывается на качестве и восприятии диссертационной работы. Список литературы пронумерован и включает 741 источник, из которых 20 – на русском языке.

Данная диссертационная работа характеризуется широтой, разносторонностью и масштабностью подхода – во введении сформулировано 12 задач, четыре из которых являются генетическими и относятся к эукариотическому участнику симбиоза, одна касается генетики прокариотического участника симбиоза, и семь относятся к области физиологии и биохимии растений. Теоретическое и практическое значение этих задач и новизна полученных результатов убедительно раскрыты во введении. Сформулировано 13 выносимых на защиту положений. Из них шесть находятся в области генетики, шесть – в области физиологии и биохимии растений и одно носит практический характер (хотя это деление условно), таким образом, материал диссертации гармонично распределяется по двум заявленным специальностям.

Впечатляет активность автора на международных конференциях, где материалы диссертации были доложены (перечислены 12 международных конгрессов), а также привлеченное финансирование и количество выполненных соискателем проектов, поддержанных 43 грантами.

Обзор литературы очень подробен и обстоятелен, подразделен на два неравноценных раздела и собственное заключение. Первый раздел занимает 124 страницы, содержит до трех дополнительных уровней рубрикации и посвящен развитию и функционированию симбиотического клубенька; тема раскрыта подробно и всесторонне. Второй раздел занимает 14 страниц и посвящен влиянию на развитие клубеньков абиотических стрессов. Набор рассмотренных стрессовых факторов довольно узок (ровно два) и отражает особенности данной работы. Два подраздела посвящены кадмию, третий – уплотнению почвы. Важность вреда кадмия как токсического тяжелого металла обоснована, но вне контекста сравнения с вредом других тяжелых металлов и прочих вредоносных веществ антропоического происхождения, что несколько снижает убедительность такого выбора. Заключение к обзору литературы включает 5 страниц и в сжатой форме дает общее представление о проблематике в области генетики, цитологии, молекулярной и клеточной биологии в контексте поставленных в настоящей работе целей и задач.

Материалы и методы описаны подробно и тщательно. Не очень понятно употребление слова «методики», к тому же употребленного с опечаткой, вместо общепринятого «методы». В работе использована впечатляющая панель из 32 мутантов гороха по признакам азотфиксации, как отмечает автор – самая представительная в мире. Два таких мутанта получены самим автором. Использование шести генетически модифицированных штаммов симбиотических бактерий, содержащих репортерные и гибридные гены, существенно расширили возможности цитобиохимических исследований автора. Применен широкий спектр методов гистохимии, световой, лазерной сканирующей конфокальной и просвечивающей электронной микроскопии, включая иммунолокализацию с использованием 12 различных антител и гистохимическое выявление суберина, каллозы и пероксида водорода. Применялись методы клонирования фрагментов ДНК в бактериях; такие молекулярные методы, как полимеразная цепная реакция, в том числе аллель-зависимая и ПЦР в реальном времени. Общее количество использованных в работе праймеров составило ни больше ни меньше как 79, в том числе один меченый радиоактивным изотопом ^{32}P . Применялась лазерная микродиссекция с последующим выделением РНК и синтезом кДНК, различные методы количественного анализа фитогормонов и продуктов экспрессии генов, в том числе репортерных. Таким образом, в работе применен самый широкий набор высокотехнологичных современных методов экспериментального исследования.

В части исследования, посвященной поиску у гороха новых мутаций по фенотипам, связанным с нарушениями формирования и функциональности клубеньков, проделана большая работа по скринингу 2069 растений второго поколения, происходящих от 425 семян, подвергнутых обработке химическим мутагеном. Было выделено 15 мутантов, неспособных формировать клубеньки или формирующие единичные клубеньки, 30 мутантов, формирующих нефункциональные клубеньки (при этом суперклубеньковых мутантов получено не было). Скрещивание растений пятого поколения на исходную линию дало начало шести мутантным линиям. Эти линии, а также четыре линии, выявленные ранее коллегами из того же коллектива, общим числом 17, были подвергнуты тестам на аллелизм. Среди них обнаружались мутации, аллельные 8 ранее выявленным генам, а один из мутантов позволил выявить ранее неизвестный локус, обозначенный как *Pssym42*. Автором затронут интересный вопрос о генотипической специфичности химического мутагенеза, отмечена высокая эффективность линии SGE в качестве исходной для экспериментов по индукции симбиотических мутаций. Не исключено, что это каким-то образом связано с тем, что в родословной данной линии имеются в том числе и дикие представители вида посевной горох. Автор делает заключение, что выявление локусов генома гороха, влияющих на клубенькообразование и симбиогенез, близко к завершению и что число таких локусов вряд ли существенно превышает 40. В опытах по генетическому картированию уточнена хромосомная локализация ранее известного локуса *Pssym31* и при этом была существенно уточнена карта группы сцепления III, а локусы *Pssym33* и *Pssym38* были впервые локализованы в группах сцепления V и I, соответственно.

Анализ широкой панели мутантов позволил выявить серию локусов гороха, участвующих в начальной стадии бактериальной инфекции и органогенеза клубенька, порядок их участия в генетической сети контроля данных процессов на этой стадии и характер аномалий фенотипа при исключении функций каждого из них. Выявлены ключевые точки взаимного контроля генетических программ начальных стадий инфекции (выявлены три такие точки) и органогенеза (одна такая точка). На основании своего фенотипического проявления ген *Pssym35* гороха был идентифицирован в качестве ортолога гена *LjNIN* японского лядвенца - первого среди генов симбиогенеза бобовых растений с выясненной первичной структурой – и просеквенирован.

Симбиотический клубенек является специализированным органом растения, предназначенным для взаимодействия с симбиотическими бактериями и их «культивирования», поэтому генетические и биохимические механизмы его формирования не менее важны, чем морфогенез «традиционных» вегетативных и генеративных органов растения. В данной работе эти механизмы изучались на глубинном уровне

распределения и влияния таких важных веществ как арабиногалактанпротеин-экстензинов, пероксида водорода, этилена, нитратов, анализа реорганизация тубулинового цитоскелета, с применением современных биохимических и микроскопических методов.

Так, было показано, что пероксид водорода не только принимает участие в защитных реакциях, но и является необходимым компонентом при созревании инфекционных нитей в ходе дифференцировки клубенька.

Была выявлена ведущая роль микротрубочек в росте и функционировании инфекционных нитей и капель. В этой части работы получены свидетельства в пользу гипотезы о существовании общей генетической программы, участвующей в формировании арбускулярно-микоризного и бобово-ризобиального симбиоза, которая первоначально возникла в контексте эволюционного формирования арбускулярной микоризы, свойственной большинству растений, и впоследствии была рекрутирована в ходе эволюционно более позднего возникновения ризобиального симбиоза, характерного только для бобовых растений.

Были получены свидетельства, что этилен контролирует развитие клубеньков на различных стадиях, в том числе что он, вероятно, контролирует активность меристемы в зрелом клубеньке.

Сравнительный генетический анализ развития детерминированных клубеньков лядвенца японского и недетерминированных клубеньков гороха посевного показал, что некоторые мутации, приводящие к неэффективному симбиозу, влияют на ингибирующий эффект нитратов на клубенькообразование, что указывает на связь этого процесса с дифференцировкой бактериоидов.

В исследованиях бактериального симбионта было показано, что экспрессия его генов постепенно уменьшается в ходе дифференцировки бактериоидов, за исключением симбиотических генов, регулируемых кислородом, при этом наибольшая репрессия достигается только в азотфиксирующих, органеллоподобных бактериоидах, утративших способность к свободноживущему росту. Некоторые мутации гороха, контролируемые поздние стадии развития симбиоза, приводят к индукции специфических защитных реакций, то есть бактериальный симбионт в некотором смысле воспринимается растением как патоген, и растение контролирует микросимбионта в течение всего существования клубенька.

Показано, что в клубеньках мутантов, у которых развитие клубеньков заблокировано, активируются гены, связанные со старением, и что старение является общим ответом на неэффективность клубенька любой природы.

Показано, что кадмий влияет не только на общее развитие растений, но и препятствует развитию и функционированию симбиотических клубеньков. Полученный в работе мутант гороха SGECdt обладает как повышенной устойчивостью к кадмию, так и накапливает его в тканях

растения; при этом устойчивость наблюдается и на уровне формирования и функционирования клубеньков. Также в работе были созданы два штамма клубеньковых бактерий гороха (3841-PsMT1 и 3841-PsMT2), содержащие кодирующие области растительных генов *PsMT1* и *PsMT2*, слитые с промоторной областью ризобияльного гена *nifH*.; инокуляция этими штаммами увеличивала содержание кадмия в корнях, клубеньках и стеблях растений. Эти и подобные им мутации макросимбионта и трансгенные штаммы микросимбионта могут быть использованы на практике для биологического улучшения почв, загрязненных тяжелыми металлами.

По результатам столь объемной и многогранной диссертации сформулировано 16 выводов, полностью соответствующих содержанию работы.

Из мелких огрехов отметим слово «медодики» как в тексте, так и в содержании. Некое исследование следовало бы назвать пионерным, а не пионерским (что указывало бы несколько иное отношение) (с. 157). Спорным является русское название «люцерна слабоусеченная» для *Medicago truncatula* (с. 170), в то время как более или менее общепринятым является «люцерна усеченная». Имеются отдельные неоправданные англицизмы («Было изолировано 3 независимо полученных мутанта...», с. 235, "предоминантный транскрипт", с. 107, 147). Встречается не объясненное понятие "Условный процент", с. 241 и далее. На Рисунках 36, 37 не указано, что за окрашивание применялось. То же относится к Рисункам 43-46, 62, 111, 113. На Рисунке 37 имеется не объясненное обозначение МК. Представляется не вполне уместным выражение типа "Расщепление в F1" (Таблица 40), поскольку F1, в полном соответствии с законами Менделя, демонстрирует единообразие, что и отражают данные Таблицы. Вызывает сомнение корректность употребления термина «клонирование» гена как синонима расшифровки его первичной структуры. Колонтитул «заключение» начинается с 421 страницы, тогда как само заключение начинается с 431 с. В выводе 3 говорится о двух генетических подпрограммах, но не упомянута программа, частями которой она является.

Достаточно объемный (42 с.) автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. Из автореферата узнаем, что по теме диссертации опубликовано ни много ни мало 40 печатных работ в журналах, рекомендованных ВАК и приравненным к ним, в том числе в таких как *Functional Plant Biology*, *Journal of Plant Physiology*, *New Phytologist*, *Protoplasma*, *Symbiosis*, *Annals of Botany*, *Biologia*, *Euphytica*, *Plant Science*, *Theoretical and Applied Genetics*.

Следует заключить, что диссертационная работа Цыганова Виктора Евгеньевича "Молекулярно-генетические и клеточные механизмы дифференцировки симбиотического клубенька», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям

03.01.05 – «физиология и биохимия растений» и 03.02.07 - "генетика" является законченным научным исследованием и квалификационным произведением, имеющим теоретическое значение для генетики эу- и прокариот и теории коэволюции и практическое значение для селекции гороха. Она выполнена на высоком методическом уровне и по актуальности, новизне данных, достоверности, объему полученного материала, значимости сделанных научных обобщений и сформулированным выводам соответствует требованиям п. 9. «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 и предъявляемого к докторским диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а сам автор, безусловно, заслуживает искомой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.05 – «физиология и биохимия растений» и 03.02.07 – «Генетика».

Научный руководитель
ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии
и генетики СО РАН»,
академик, профессор,
доктор биологических наук
по специальности 03.02.07 - генетика



Колчанов Николай Александрович

630090, Новосибирск,
пр. акад. Лаврентьева 10,
ИЦиГ СО РАН,
+7 913 9192364
kol@bionet.nsc.ru