



Утверждаю

Е. Поткина

« 8 » июня 2018 г.

И.о. зам. директора ВИР по науке
д.б.н., Е.К. Поткина

ОТЗЫВ

ведущего учреждения 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

Симбиозы растений с полезной почвенной микрофлорой, включающей азотфиксирующих прокариот, - важнейшие факторы адаптации. Известно, что создающиеся в результате симбиоза надорганизменные генетические системы приобретают принципиально новые признаки, отсутствующие у партнеров вне взаимодействия. Эти новые признаки значительно расширяют их экологические возможности. Диссертация В.Е.Цыганова посвящена клеточным механизмам дифференцировки симбиотического клубенька у гороха, как результата координированной экспрессии генов обоих симбионтов. Выяснение структурно-функциональных основ симбиотического взаимодействия, а именно формирования азотфиксирующего клубенька, его генетической детерминированности является **актуальным** для развития теоретических основ симбиоза, понимания процессов дифференциации тканей, формообразования, в целом биологии развития. Кроме того, это актуально и для прикладного использования симбиотических взаимоотношений: научно-обоснованной селекции принципиально новых сортов с повышенной эффективностью азотфиксации.

Учитывая сложность функционирования надорганизменной системы, где совместно, сопряженно и слаженно должны действовать, как минимум, два партнера, необходим комплексный, интегрированный подход к ее изучению. Поэтому механизмы таких взаимодействий изучают команды генетиков, молекулярных биологов, микробиологов, цитологов, физиологов и т.п. То есть перед диссертантом стояла проблема некой методической универсальности, с чем он справился блестяще.

Многие аспекты и этапы взаимодействия ризобий и гороха изучены как сотрудниками ВНИИСХМ, откуда вышла данная работа, так и другими учеными, включая международные коллективы.

Данная работа интересна тем, что она детализирует и выявляет генетические и молекулярные детерминанты, биохимические компоненты, а также структурно-клеточные основы процесса взаимодействия симбионтов поступательно, последовательно, начиная с момента узнавания партнеров друг другом, заканчивая старением и умиранием клубенька.

Диссертация изложена на 509 страницах. Основные компоненты ее структуры: введение, 3 главы, заключение, выводы и список литературы. Последний содержит 741 литературных источников. Первая и вторая главы – традиционно – «Обзор литературы» и «Материал и методики». В третьей главе изложено все исследование. Это вынудило автора к излишнему дроблению текста, его дискретности и усложнению нумерации разделов. Гораздо логичнее и практичнее было бы подразделить экспериментальную часть на несколько глав.

Приводим краткий обзор работы.

В первой главе «Генетический контроль клеточных механизмов развития и функционирования симбиотического клубенька» изложены современные представления о событиях, изучению которых посвящена данная работа. обстоятельно (как и все в данной работе) изложены все стадии развития и функционирования клубенька, начиная с сигналинга, начального взаимодействием ризобий и растения, заканчивая старением клубенька. Подробно изложены факторы, запускающие программу инфекции и развития клубенька. Дальнейшие события, а именно рост инфекционной нити, формирование клубенькового примордия в клетках коры корня, выход бактерий в цитоплазму клеток растения, формирование меристем у недетерминированных клубеньков и т.д. описаны как с позиций их молекулярно-генетической детерминации, так и структурно-клеточных механизмов. Большое внимание уделено обзору работ о тубулиновом цитоскелете в клетках клубеньков, поскольку как известно, и как показано самим диссертантом, реорганизация цитоскелета является одним из основных механизмов дифференцировки клеток симбиотического клубенька.

Автор считает, что органогенез клубенька зависит от степени развития процесса инфекции и вовлекает в обзор множество известных фактов, подтверждающих это. Следует отметить, что в обзоре в качестве схематического изображения описываемых процессов приведены иллюстрации из цитируемых работ, в подписях к которым детально и

доступно обобщаются основные этапы органогенеза и функционирования клубенька.

Далее освещены современные представления о влиянии на формирование клубенька фитогормонов (ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты, этилена и брассиностероидов) и таких важных сигнальных молекул, как жасмоновая кислота, стриголактоны и оксид азота.

Заканчивают обзор немногочисленные пока литературные данные о влиянии на формирование клубеньков таких эдафических стрессоров как загрязнение почвы кадмием и ее уплотнение.

В целом литературный обзор свидетельствует о широкой эрудиции автора, интегрированного знания им различных аспектов изучаемой проблемы.

Глава 2 знакомит с материалом и методами исследования. Наряду с горохом растительный материал включал модельные виды бобовых: лядвенец японский (*Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen) и люцерну слабоусеченную (*Medicago truncatula* Gaertn.). Были использованы различные штаммы ризобий: *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. Поскольку в задачи данного исследования входило выяснение влияния эдафических стрессоров на развитие корневой системы и симбиотических клубеньков у гороха материалом явились также полученные в ходе выполнения данной работы мутанты гороха: SGEcrt, характеризующийся повышенной чувствительностью к плотности субстрата (Tsyganov et al., 2000), и SGEcdt, характеризующийся повышенной устойчивостью к кадмию и повышенной его аккумуляцией (Tsyganov et al., 2007).

В работе использован комплекс методов генетики, физиологии, молекулярной биологии. Для идентификации генов бобовых, вовлеченных в развитие и функционирование симбиоза, использовали экспериментальный мутагенез, исследование дифференциальной экспрессии генов, гибридологический анализ. Применен современный набор методов молекулярной генетики: выделение ДНК растений и бактерий, выделение плазмидной ДНК, рестрикция ДНК с помощью эндонуклеаз, лигирование ДНК; ПЦР с детекцией в реальном времени и т.д., а также физиологические методы анализа влияния экзогенных гормонов и определения содержания гормонов.

Использовали достаточно большой арсенал методов микроскопии: световой, лазерной сканирующей конфокальной и электронной, с применением гистохимических и цитохимических методик.

В третьей, основной главе диссертации подробно и последовательно излагается исследование двух генетических подпрограмм развития симбиотического клубенька: 1) инфекции тканей клубенька ризобиями («судьбы» бактериальной клетки) и 2) органогенеза клубенька. Существование этих подпрограмм обосновано с участием автора диссертации и им выявлено наличие точек взаимного контроля реализации данных подпрограмм: 3 точек для инфекции тканей клубенька ризобиями и одной для органогенеза клубенька.

Анализ этой большой главы нам проще привести тезисно, положив в основу тезисов *элементы новизны* исследования, которых в работе множество.

На современном этапе известно около 40 генов гороха, участвующих в становлении симбиотических отношений с ризобиями. Автор диссертации расширил коллекцию симбиотических мутантов гороха, выявил новые серии аллельных мутантов для ряда групп комплементации симбиотических генов гороха и описал новый локус — *Pssym42*. Впервые ряд симбиотических локусов картирован на генетической карте гороха.

На основе фенотипической характеристики большого набора *Nod*-мутантов гороха классифицированы симбиотические гены гороха в соответствии со стадией развития клубенька, которую они контролируют.

Впервые на основе анализа микросинтезии генома гороха с геномом *Lotus japonicus* и с использованием детальной характеристики фенотипических проявлений мутаций клонирован симбиотический ген гороха *Pssym35*, что является абсолютно новаторским не для модельных бобовых объектов.

Наличие цитоскелета - неперенное условие приобретения и поддержания дифференцированной клеткой требуемой формы. Поэтому большое место в работе заняло изучение роли реорганизации тубулинового цитоскелета в дифференцировке клеток симбиотических клубеньков гороха и *M. truncatula* при реализации поздних этапов генетической программы симбиотического партнерства. Впервые продемонстрирована трехмерная организация тубулинового цитоскелета клубеньков, которая сопоставлена с организацией симбиотических структур в каждой гистологической зоне клубенька. Характер организации микротрубочек в клетках инфицированных и неинфицированных тканей позволил лишней раз утвердиться в том, что дифференцировка клеток клубенька тесно связана с дифференцировкой бактерий и/или их функционированием. Выявлено, что микротрубочки в инфицированных клетках *Medicago truncatula* и гороха, а также судя по литературным данным о них в литературе для других бобовых - сои и люпина

имеют различный паттерн. Этот факт в числе ряда других межвидовых различий процесса автор диссертации причисляет к доводам, собираемым в копилку иницируемого им нового научного направления - сравнительной клеточной биологии бобовых растений. Следует отметить высокое качество фотографий со срезов с иммунолокализацией тубулинов, иллюстрирующих этот раздел работы.

Показана детерминированность направленной секреции арабиногалактанпротеин-экстензинов - основного компонента матрикса инфекционных нитей и капель - при их нормальном и аномальном развитии. Доказано также участие пероксида водорода в росте и созревании инфекционных структур. Убедительно показано, что этилен контролирует развитие клубеньков на различных стадиях: при росте инфекционной нити в коре корня, а также при формировании клубеньковой меристемы, и вероятно, контролирует ее функционирование в зрелом клубеньке. И если регуляция этиленом развития инфекционной нити была известна ранее, то роль этилена в регуляции функционирования меристемы в недетерминированном клубеньке показана впервые.

Полученные ранее другими исследователями сведения о характере экспрессии генов ризобий при реализации генетической подпрограммы инфекции тканей клубенька у гороха дополнены новыми сведениями, полученными методами гистохимического окрашивания срезов клубеньков. Выявлено снижение экспрессии генов в азотфиксирующих бактериоидах. Показано, что способность к возвращению к свободноживущему состоянию бактерий теряется на финальных стадиях дифференцировки бактериоидов. Правда, не совсем понятна формулировка автора "дифференцировка бактериоидов при недетерминированном симбиогенезе является постепенным (?) процессом...". Имеется ввиду продолжительным по времени?

Впервые показано, что растения гороха могут воспринимать ризобии в качестве патогенов в случае единичных мутаций в генах, контролирующих поздние стадии развития клубенька. В связи с этим очень интересными и информативными представляются визуализированные с помощью микроскопов процессы защитных реакций со стороны растения при реализации поздних этапов генетической программы симбиогенеза у мутантных форм. Низко метилированный пектин, инкапсулирующий неэффективные бактериоиды, высокий уровень суберинизации как оболочки инфекционной нити, так и клеточных стенок коры корня, предотвращающей проникновение бактерий в цитоплазму растительной клетки и последующую дифференцировку в бактериоиды, и впервые описанные отложения каллозы в этих структурах, по нашему мнению - универсальные механизмы защитных

реакций клеток растений в целом ряде процессов и прежде всего, при патогенезе. В частности, каллоза появляется в клетках при воздействии стрессоров: инфицировании растений патогенными грибами, механических повреждениях, инактивации проводящих элементов, в дегенерирующих структурах и т.п. или при генетической несовместимости с пестиком в пыльцевых зернах и трубках, папиллах рыльца. То есть сведения, полученные автором, дополняют перечень процессов, где данный полисахарид играет изолирующую функцию, и убедительно свидетельствуют о том, что полезные бактерии в ходе неэффективного симбиогенеза выполняют функцию стрессоров.

Впервые показано, что старение клубенька является универсальной реакцией на неэффективность симбиоза. Это заключение сделано на основании наблюдений над проявлением активации генов, ассоциированных со старением в клубеньках мутантов, у которых развитие клубеньков блокировано на различных стадиях.

Абсолютно новаторскими элементами работы являются исследования, связанные с мутациями, выявленными у гороха автором диссертации впервые: мутантом SGECDt, характеризующимся повышенной устойчивостью к кадмию и мутантом SGEcrt с повышенной чувствительностью корневой системы к плотности субстрата. Эти мутанты послужили адекватными генетическими моделями для исследования влияния на растительно-микробные системы означенных стрессоров. Это имеет большое практическое значение для ремедиации загрязненных, заплывающих почв, а также для направленной селекции устойчивых к данным стрессорам генотипов.

Заканчивая обзор диссертации, еще раз хочется подчеркнуть ее насыщенность новой информацией, полученной на основе применения современных методов исследования.

Данная работа внесла существенный вклад в симбиогенетику, прояснив и детализировав целый ряд генетических, молекулярных, физиологических, цитологических механизмов становления мутуалистического симбиоза у гороха – развития азотфиксирующего клубенька как следствия инфицирования растения ризобиями. При этом данная работа является очередным примером, типизирующим все научные работы ВНИИСХМ, примером того, как фундаментальная наука служит насущным потребностям сельского хозяйства, а именно: селекции, растениеводству, земледелию.

Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам.

Основные результаты и выводы данной работы нашли отражение в 40 публикациях автора на русском и английском языках в высокорейтинговых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Кроме

того, методология исследования и его промежуточные результаты прошли апробацию в ходе ряда российских и международных конференций, симпозиумов и семинаров, где автор выступал с докладами. При этом нужно отметить высокую цитируемость работ В.Е.Цыганова, а также его прочную интеграцию с международным сообществом симбиогенетиков.

По поводу инициации нового направления исследований — сравнительной клеточной биологии бобовых растений хочется заметить, что в данной трактовке это предполагает вовлечение в исследования чрезвычайно многочисленных структур, тканей и органов растений одного из самых крупных многовидовых семейств. Возможно, для начала, учитывая специализацию автора диссертации, можно ограничиться сравнительной клеточной биологией симбиотических структур бобовых растений. Впрочем, мы совсем не претендуем на ограничение дерзаний автора диссертации.


В качестве не столько замечания, сколько пожелания, хотелось бы увидеть в работе понимание автором термина «симбиогенез», который он употребляет «по умолчанию». Долгое время под симбиогенезом понимали гипотезу о происхождении организмов путем симбиоза, происхождение эукариот в результате слияния и дальнейшего сосуществования (симбиоза) различных прокариотических организмов. Это понимание восходит к работам начала XX века и связано с именами К.С.Мережковского, А.С.Фаминцына, Б.М.Козо-Полянского. С некоторых пор понятие термина расширилось и трактуется как «генетическая интеграция неродственных организмов» (Проворов, Тихонович, Воробьев, 2015), «кооперация организмов», «эволюция симбиоза» (Савинов, 2008; 2016) и т.п. В.Е.Цыганов, судя, по использованию термина, понимает это как непосредственно процесс формирования симбиотических взаимоотношений между растением и ризобиями. Но хотелось бы услышать это от самого автора диссертации.

Материалы этой многогранной работы могут быть включены в лекционные курсы ВУЗов по генетике растений и симбиогенетике, в практические занятия по частной генетике, а также в курсы, излагающие физиологические основы дифференциации тканей и органов. Они наверняка будут полезны и наиболее продвинутым селекционерам, интересующимся развитием симбиотической селекции. Пионерами такой селекции гороха явились селекционеры ВНИИЗБК (г.Орел), куда также можно рекомендовать для внедрения результаты этой работы.

Заключение. Диссертация В.Е.Цыганова «Молекулярно-генетические и клеточные механизмы дифференцировки симбиотического клубенька», является законченной научно-квалификационной работой, вносящий весомый вклад в фундаментальные исследования экономически значимой в РФ

зернобобовой культуры. При этом задачи, решенные автором диссертации, имеют и важное хозяйственное значение. Диссертация полностью соответствует критериям, установленным постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г., № 842 (пп.9,10,11,13,14) «Положения о порядке присуждения ученой степени»), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.05 Физиология и биохимия растений и 03.02.07 Генетика.

Отзыв заслушан и утвержден на заседании отдела генетических ресурсов зернобобовых культур ВИР 07 июня 2018 г., протокол № 2.



*Рецензент доктор биол. наук, профессор,
гл. н. сотр., зав. отд. генетических ресурсов
зернобобовых культур, профессор
Вишнякова Маргарита Афанасьевна*

ФАНО ФГНБУ «Федеральный исследовательский центр. Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР)
Адрес – 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44.
e-mail: m.vishnyakova.vir@gmail.com; телефон: +7(812)312-51-61.

Подпись Вишняковой М.А.
УДОСТОВЕРЯЕТСЯ
Зав. канцелярией ВИР

