

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр
«Казанский научный центр
Российской академии наук»
д. ф.-м. н., профессор РАН Калачев А.А.



05 ноября 2021 г.

Отзыв ведущей организации

на диссертационную работу Ивановой Киры Андреевны
«Роль низкомолекулярных тиолов в развитии и функционировании
эффективных и неэффективных симбиотических клубеньков гороха
посевного (*Pisum sativum* L.)»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.21 – Физиология и биохимия растений

Диссертационная работа Ивановой Киры Андреевны посвящена изучению молекулярно-генетических механизмов формирования и функционирования симбиотических клубеньков бобовых растений. Работа является составной частью исследования, проводимого в течение ряда лет в лабораториях Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии».

Как справедливо отмечает автор, способность бобовых растений формировать азотфиксирующие симбиотические клубеньки в условиях недостатка азота является одним из важнейших эволюционно-значимых механизмов адаптации растений к меняющимся условиям среды. Несмотря на длительную историю изучения морфологических, биохимических и молекулярных особенностей формирования и функционирования симбиотических клубеньков бобовых растений, расшифровка роли окислительно-восстановительных механизмов регуляции этих процессов имеет особую актуальность. Известно, что многие метаболические процессы, протекающие в азотфиксирующих клубеньках, сопровождаются образованием активных форм кислорода (АФК). Для предотвращения

токсических последствий избыточного накопления АФК необходима многоуровневая антиоксидантная защита, важным элементом которой является тиоловый трипептид глутатион GSH. Глутатион – ключевой антиоксидантный буфер клеток растений. Соотношение его окисленной и восстановленной форм является определяющим фактором формирования редокс-потенциала, необходимого для эффективного функционирования клеток. Наличие у бобовых растений уникального гомолога GSH – гомоглутатиона (hGSH), неоднозначность функций тиолов в функционировании клубеньков и проявлении защитных реакций при патогенном инфицировании делают тему диссертационной работы К.А. Ивановой особенно актуальной.

Для достижения цели автором были поставлены задачи проанализировать проявления защитных реакций в клубеньках неэффективных мутантов гороха, изучить содержание GSH и hGSH, активность генов их синтеза, а также иммулокализацию GSH в эффективных и неэффективных клубеньках. Кроме того, в задачи исследования входило изучение развития эффективных и неэффективных клубеньков при обработке ингибитором биосинтеза глутатиона и добавлении экзогенного GSH. Диссертационная работа содержит комплексный подход к решению поставленных задач.

Диссертационная работа К.А. Ивановой изложена на 160 страницах машинописного текста, включает 23 рисунка и 6 таблиц и оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми ВАК. Работа построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 337 работ на русском и английском языках.

Во Введении автор обосновывает актуальность выбранной темы, формулирует цель и задачи исследования, характеризует ее научную новизну, теоретическую и практическую значимость, формулирует основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы представляется детальным, в нем освещается современное состояние проблемы. Автор демонстрирует свою эрудицию, подробно описывая механизмы формирования и эффективного функционирования симбиотических клубеньков бобовых растений. К.А. Иванова подчеркивает, что «На каждой стадии инфекции ризобиями происходят как адаптивные процессы, обеспечивающие симбиотическое взаимодействие», так и процессы, активируемые при патогенезе растений. Автор критически отмечает, что «вопрос относительно границы между

мутуалистическими и антагонистическими отношениями при формировании бобово-ризобиального симбиоза» остается недостаточно изученным.

Особое внимание в главе Обзора литературы уделяется молекулярным механизмам формирования иммунитета растений и роли иммунных процессов в бобово-ризобиальном симбиозе. В частности, подробно описывается роль Nod-факторов и поверхностных компонентов ризобий, в том числе экзополисахаридов, липополисахаридов, глюканов, а также систем секреции третьего и четвертого типов. В Обзоре литературы детально освещается роль АФК и глутатиона в формировании и функционировании симбиотического клубенька. Отмечается, что «стратегическое положение между клеточными окислителями и восстановителями делает систему глутатиона идеальной для выполнения сигнальных функций», в том числе связанных с формированием симбиоза бобовых растений и клубеньковых бактерий.

Экспериментальная часть начинается с описания объектов и методов, использованных автором. Несомненным достоинством диссертационной работы К.А. Ивановой является комплексность подходов и современный методический уровень исследований. Экспериментальные данные получены с использованием классических и современных гистологических, цитологических, биохимических и молекулярно-биологических подходов и методов. В работе были использованы растения гороха посевного дикого типа, формирующего азотфиксирующие клубеньки, и неэффективные симбиотические мутанты по генам *Sym40* и *Sym33* из коллекции ФГБНУ ВНИИСХМ. В целом, характер изложения этой главы предполагает возможность воспроизведения экспериментов при постановке аналогичных условий. Хотелось бы особо выделить скрупулезность в описании протоколов детекции и оценки уровня глутатиона методами высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией. Кроме того, автором проведена большая экспериментальная работа по гистохимическому анализу эффективных и неэффективных клубеньков. Особо хотелось бы отметить высокое качество рисунков по иммунолокализации глутатиона. Проведенная экспериментальная работа свидетельствует о трудолюбии, скрупулезности и мастерстве экспериментатора К.А. Ивановой.

В диссертационной работе К.А. Ивановой представлены оригинальные экспериментальные данные. Так, автором охарактеризовано проявление защитных реакций в неэффективных симбиотических мутантах, в частности, отложение суберина в клеточной стенке и арест клубеньковой меристемы, что приводит к остановке формирования клубенька. Анализ уровня экспрессии генов – молекулярных маркеров защитного ответа подтвердил наличие

повышенного уровня транскрипции данных генов у мутантов, в отличие от такового у линии дикого типа. Таким образом, автором показано, что нарушение программы развития клубенька приводит к восприятию полезных ризобий в качестве потенциальных патогенов и индуцирует проявление защитного ответа. В качестве замечания можно отметить недостаточную обоснованность выбора трех «стрессовых» генов, поскольку каждый из них является одним из представителей многочисленных генных семейств. Можно пожелать в будущих исследованиях расширить линейку «стрессовых генов».

В работе представлены убедительные доказательства того, что необходимым условием развития симбиотического клубенька является изменение содержания тиолов GSH и hGSH и активности генов их биосинтеза. В эффективных клубеньках гороха более высокое соотношение GSH к hGSH способствует функционированию меристемы клубенька и бактериоидов при формировании симбиоза. Оригинальными представляются данные о влиянии обработки корней ингибитором синтеза глутатиона L-бутионин-S,R-сульфоксимином (BSO). Впервые продемонстрировано, что в неэффективных симбиотических клубеньках недостаток тиолов приводит к нарушению меристемы, роста инфекционных нитей и деления симбиосом, а в эффективных – к преждевременной деградации симбиотических структур. Обработка экзогенным GSH ожидаемо приводила к повышению уровня эндогенного глутатиона с некоторой разницей в клетках дикого типа и мутантах и стимулировала активность генов стрессового ответа. Визуализированы интересные морфологические последствия. Тем не менее, при интерпретации данных экспериментов с экзогенным GSH стоит иметь в виду быструю скорость превращения восстановленной формы глутатиона в окисленную. В будущих экспериментах можно порекомендовать оценить соотношение GSSG/GSH.

Таким образом, результаты проведенного К.А. Ивановой исследования достоверно свидетельствуют о том, что глутатион восстановленный необходим для функционирования меристемы клубенька гороха и бактериоидов при эффективном симбиозе. Регулирование содержания глутатиона может быть важным инструментом повышения эффективной симбиотической азотфиксации растений. Работа, несомненно, имеет перспективы развития, в том числе по выявлению специфической роли гомоглутатиона в развитии и функционировании симбиотических клубеньков. Это направление представляется чрезвычайно перспективным, в том числе с эволюционной точки зрения.

Диссертационная работа К.А. Ивановой завершается обстоятельным заключением и выводами, в которых отражена фундаментальная значимость исследования.

Диссертация написана хорошим литературным языком. Тем не менее, в работе есть технические недостатки, в частности, в некоторых предложениях страдает пунктуация. Не совсем удачным представляется название подглавы «Роль иммунитета растений в бобово-ризобиальном симбиозе» (с. 34), есть и некоторые другие неудачные словосочетания. На рис. 12 отсутствует градация оси ординат. Тем не менее, эти небольшие технические недостатки не умаляют несомненных достоинств работы в целом.

Оценивая диссертационную работу К.А. Ивановой, следует отметить, что содержание и структура работы полностью отражают итоги исследований, суммированы в заключении и выводах и в достаточной степени представлены в автореферате. Полученные результаты широко апробированы, выводы обоснованы материалом, полученным лично соискателем. Статистическая обработка результатов исследования была выполнена корректно, с использованием современных компьютерных программ. Основные результаты диссертации опубликованы в печати и доложены на различных конференциях. Принципиальных недостатков диссертационная работа не имеет.

Диссертационная работа К.А. Ивановой является законченным самостоятельным научным исследованием и вносит теоретический и практический вклад в понимание молекулярных механизмов формирования и функционирования симбиотических клубеньков бобовых растений. Полученная в ходе выполнения данной диссертационной работы информация обогащает современное знание проблемы. Полученные результаты могут быть использованы в биологических, сельскохозяйственных, биотехнологических научных институтах, а также в ВУЗах при чтении курсов по физиологии и биохимии растений, биотехнологии. По теоретическому уровню, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости диссертационная работа К.А. Ивановой «Роль низкомолекулярных тиолов в развитии и функционировании эффективных и неэффективных симбиотических клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum* L.)» полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям в соответствии с пунктом 8 «Положения о порядке присуждения ученой степени». Автор работы, Кира Андреевна Иванова, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – Физиология и биохимия растений.

Диссертация и отзыв обсуждены на совместном заседании лабораторий окислительно-восстановительного метаболизма и оксилипинов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» 7 октября 2021 года.

Заведующая лаборатории
окислительно-восстановительного метаболизма
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр
«Казанский научный центр
Российской академии наук»,

доктор биологических наук

E-mail: minibaeva@kibb.knc.ru

Ф.В. Минибаева

Подпись Минибаевой Ф.В. заверено
главой группы секретарь ФИЦ Казань РАН
К.Х.И. Зинашвили С.А.

E-mail: sufia@knc.ru

420111 Казань, ул. Лобачевского 2/31
Тел. (843) 292-75-97

