

## Сведения о результатах публичной защиты

**Кусакин Пётр Глебович**

Диссертация «Анализ регуляции дифференцировки растительных клеток при развитии симбиотического клубенька гороха (*Pisum sativum* L.)»

**И.о. Председателя** д.б.н. Шнеер Виктория Семеновна

**Присутствовали:** д.б.н. Лянгузова Ирина Владимировна (ученый секретарь), д.б.н. Андреев М. П., д.б.н. Горшков В. В. (удал.), к.б.н. Демченко К. Н., д.б.н. Крышень А. М. (удал.), д.б.н. Медведев С. С., д.б.н. Нешатаева В.Ю., д.б.н. Новожилов Ю. К., д.б.н. Родионов А. В. (удал.), д.б.н. Сафронова И. Н., д.б.н. Тарасова В. Н. (удал.), д.б.н. Холод С. С., д.б.н. Цыганов В. Е., д.б.н. Шереметьев С. Н. (удал.), д.б.н. Шишова М.Ф. (удал.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.002.02,  
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО  
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ БОТАНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА  
ИМ. В.Л. КОМАРОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ПО  
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА  
НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 13 апреля 2023 г. № 167

О присуждении Кусакину Петру Глебовичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Анализ регуляции дифференцировки растительных клеток при развитии симбиотического клубенька гороха (*Pisum sativum* L.)» по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений принята к защите 8 февраля 2023 г. (протокол заседания № 166) диссертационным советом 24.1.002.02, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук, 197022, г. Санкт-Петербург, вн.тер.г. муниципальный округ Аптекарский остров, ул. Профессора Попова, д. 2, литера В, приказ Рособнадзора №

737-465 от 04.04.2008 с внесенными изменениями, утвержденными приказами: приказ Рособнадзора № 426-214 от 15.03.2010, приказы Минобрнауки России № 194/нк от 22.04.2013, № 153/нк от 15.02.2016, № 403/нк от 10.05.2017; № 409/нк от 12.04.2018, № 175/нк от 02.10.18, № 335/нк от 18.04.2019, № 661/нк от 30.10.2020, № 561/нк от 03.06.2021, № 458/нк от 07.06.2021, № 573/нк от 09.06.2021, № 1162/нк от 12.10.2022.

Соискатель Кусакин Пётр Глебович, 14 октября 1993 года рождения. В 2014 году окончил бакалавриат Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения профессионального высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» по направлению «Биология», в 2016 году окончил магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» по направлению «Биология». В 2021 году окончил очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки.

Работает научным сотрудником в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярной и клеточной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель — доктор биологических наук Цыганов Виктор Евгеньевич, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», директор.

Официальные оппоненты:

Топунов Алексей Фёдорович — доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», институт биохимии им. А.Н. Баха, заведующий лабораторией биохимии азотфиксации и метаболизма азота;

Лебедева Мария Александровна — кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», старший научный сотрудник кафедры генетики и биотехнологии

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Уфимский институт биологии — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа, в своем положительном отзыве, подписанном Высоцкой Лидией Борисовной, доктором биологических наук, ведущим научным сотрудником лаборатории физиологии растений, указала, что работа представляет собой законченное исследование, содержит новые научные данные и аргументированные выводы. Поставленные цели и задачи были выполнены, исследование представляет теоретический и практический интерес. Представленная диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года (№ 842), а её автор, Пётр Глебович Кусакин, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений.

Соискатель имеет 18 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 14 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 6 статей, из них 5 — в изданиях, индексируемых в базе данных Web of Science.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Kitaeva A.B., Gorshkov A.P., **Kusakin P.G.**, Sadovskaya A.R., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. Tubulin cytoskeleton organization in cells of determinate nodules // *Frontiers in Plant Science*. — 2022. — V. 13. — P. 823183.
2. Tsyganova A.V., Kitaeva A.B., Gorshkov A.P., **Kusakin P.G.**, Sadovskaya A.R., Borisov Y.G., Tsyganov V.E. *Glycyrrhiza uralensis* nodules: histological and ultrastructural organization and tubulin cytoskeleton dynamics // *Agronomy*. — 2021. — V. 11, № 12. — P. 2508.
3. **Kusakin P.G.**, Serova T.A., Gogoleva N.E., Gogolev Y.V., Tsyganov V.E. Laser microdissection of *Pisum sativum* L. nodules followed by RNA-seq analysis revealed crucial transcriptomic changes during infected cell differentiation // *Agronomy*. — 2021. — V. 11, № 12. — P. 2504.
4. Kitaeva A.B., Gorshkov A.P., Kirichek E.A., **Kusakin P.G.**, Tsyganova A.V., Tsyganov V.E. General patterns and species-specific differences in the organization of the tubulin cytoskeleton in indeterminate nodules of three legumes // *Cells*. — 2021. — V. 10, № 5. — P. 1012.
5. Dolgikh E.A.\* , **Kusakin P.G.\***, Kitaeva A.B., Tsyganova A.V., Kirienko A.N., Leppyanen I.V., Dolgikh A.V., Ilina E.L., Demchenko K.N., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E.

Mutational analysis indicates that abnormalities in rhizobial infection and subsequent plant cell and bacteroid differentiation in pea (*Pisum sativum*) nodules coincide with abnormal cytokinin responses and localization // *Annals of Botany*. — 2020. — V. 125, № 6. — P. 905-923.

*\*Авторы внесли равный вклад в работу*

6. Китаева А.Б., Кусакин П.Г., Демченко К.Н., Цыганов В.Е. Методические особенности изучения тубулинового цитоскелета в клубеньках бобовых растений // *Сельскохозяйственная биология*. — 2018. — Т. 53, № 3. — С. 634-644.

В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

На диссертацию и автореферат поступило 6 отзывов от:

1. **Платонова Андрея Викторовича** — кандидата биологических наук, доцента Федерального казенного образовательного учреждения высшего образования «Вологодский институт права и экономики Федеральной службы исполнения наказаний» (ВИПЭ ФСИН России)

2. **Демидчика Вадима Викторовича** — доктора биологических наук, члена-корреспондента НАН Беларуси, декана биологического факультета Белорусского государственного университета

3. **Фёдоровой Елены Эриковны** — кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника группы растительно-микробных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН»

4. **Тарчевского Игоря Анатольевича** — академика РАН, главного научного сотрудника группы белкового метаболизма Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН»; **Егоровой Алевтины Михайловны** — кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника группы белкового метаболизма Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН»

5. **Вишняковой Маргариты Афанасьевны** — доктора биологических наук, профессора, главного научного сотрудника отдела генетических ресурсов зернобобовых культур Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»

6. **Андропова Евгения Евгеньевича** — доктора биологических наук, главного

научного сотрудника лаборатории микробиологического мониторинга и биоремедиации почв Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»

Все отзывы положительные. В отзывах отмечено, что диссертационная работа является актуальным и законченным исследованием, выполненном на высоком методическом уровне, результаты и методы изложены ясно с использованием качественного иллюстративного материала, а выводы сделаны на основе анализа изложенных результатов. Работа имеет большую теоретическую и практическую значимость.

**Платонову Андрею Викторовичу** хочется услышать мнение автора по поводу перспектив применения полученных научных данных в практике сельскохозяйственного производства.

**Вишнякова Маргарита Афанасьевна** отмечает, что аппарат для сравнения процессов у разных видов должен быть достаточно убедителен не только в плане их функциональных аналогий, но и в синхронности, то есть исследовании протекаемых процессов на одних и тех же стадиях.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что Топунов Алексей Фёдорович является крупным специалистом, имеющим публикации в области физиологии растений, изучения бобово-ризобияльного симбиоза и биохимии. Лебедева Мария Александровна — известный специалист, имеющая публикации в области физиологии растений, изучения гормонального контроля развития симбиотического клубенька. Уфимский Институт биологии — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук известен своими достижениями в области изучения влияния внешних факторов на содержание в растениях гормонов, их участия в ответных реакциях, определяющих адаптацию растений к изменяющимся условиям окружающей среды, в том числе и при взаимодействии с микроорганизмами, что позволяет ведущей организации определить научную и практическую значимость диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что соискателем изучена регуляция дифференцировки инфицированных клеток в ходе развития симбиотического клубенька гороха, показано значительное изменение транскриптомных профилей инфицированных клеток клубенька при их дифференцировке, получены свидетельства об участии цитокининов в дифференцировке тканей клубенька и формировании симбиосом, а также об их возможном влиянии на процесс выхода бактерий в цитоплазму растительных клеток и

их дифференцировки, и роли в негативной регуляции роста инфекционных нитей и развития инфекционных капель. В работе была разработана методика количественного анализа организации тубулиновых микротрубочек и актиновых микрофиламентов, позволяющая подготавливать для анализа изображения, полученные с использованием флуоресцентных меток и лазерного сканирующего конфокального микроскопа, выделять элементы цитоскелета и рассчитывать количественные показатели, что даёт возможность проводить количественный анализ организации как тубулинового, так и актинового цитоскелета в клетках клубеньков.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: доказаны положения, вносящие вклад в существующие представления о процессах дифференцировки растительных клеток симбиотического клубенька гороха; применительно к проблематике диссертации результативно использованы современные методы биоинформатики, иммуногистохимии, микроскопии, оптимально подобранные для решения поставленных задач; изложены положения о регуляции дифференцировки инфицированных клеток клубенька на транскриптомном и гормональном уровнях, а также показана связь между дифференцировкой растительных клеток и перестройками тубулинового и актинового цитоскелета.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что: определены группы генов, специфичных для конкретных стадий дифференцировки растительной клетки, что позволяет более детально изучать ключевые для развития клубенька гены; представлены свидетельства о связи цитокининов с развитием клубенька на поздних этапах, что является важным шагом в разработке более эффективных растительно-микробных систем на основе бобово-ризобиального симбиоза; разработана методика количественного анализа элементов цитоскелета в клетках клубеньков, которая уже активно используется при сравнении организации тубулинового и актинового цитоскелета в клубеньках различных видов Бобовых.

Оценка достоверности результатов исследования выявила: результаты получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов исследования в различных условиях; теория построена на известных, проверяемых данных и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации. Выносимые на защиту положения и выводы хорошо аргументированы, полностью отвечают поставленной цели и задачам; использовано сравнение авторских данных о различных аспектах регуляции дифференцировки растительных клеток в клубеньке и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике; установлено качественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в мировой литературе.

Личный вклад соискателя состоит в: анализе литературного материала по тематике исследований; планировании и проведении экспериментальной работы; статистической обработке, анализе, обобщении и интерпретации полученных данных; написании статей, опубликованных по теме диссертационной работы; представлении результатов на научных конференциях. Диссертация написана автором самостоятельно.

В ходе защиты диссертации не было высказано критических замечаний.

Соискатель Кусакин П.Г ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию.

Вопрос д.б.н. Медведева С.С. С чем связан такой набор изучавшихся форм цитокинина? Изучались ли свободные формы цитокинина?

Ответ: С тем, что это основные формы цитокининов. Мы изучали именно транспортные формы, поскольку известно, что они свободно конвертируются в активные формы в месте действия.

Вопрос д.б.н. Медведева С.С. Как можно объяснить переориентацию микротрубочек с поперечной на беспорядочную при дифференцировке клеток?

Ответ: Мы предполагаем, что это связано с характером роста. Изначально клетки растут анизотропно, они вытянуты, а при переходе к азотфиксации клетки должны вместить большое количество бактериоидов и, вероятно, это эволюционно оправданный переход, чтобы клетка могла увеличиться в размерах и стать круглой, а не вытянутой.

Вопрос д.б.н. Медведева С.С. В Gene Ontology у Вас изменяются гены, связанные с ауксиновым ответом, а с цитокининовым не увидел. А Вы делаете вывод, что цитокининовый сигналинг тоже меняется при переходе. С чем это связано?

Ответ: Да, в биологических процессах нет цитокинина, он появляется не как отдельная группа, а если смотреть на группы, связанные с молекулярной функцией. И в группе, связанной с генами, которые участвуют в киназных реакциях, как раз есть гены, связанные с передачей цитокининового сигнала. А вывод связан с тем, что изменяются не гены, которые напрямую работают в трансдукции цитокининового сигнала, а гены, для которых показано их влияние на регуляцию трансдукции цитокининового сигнала.

Вопрос д.б.н. Медведева С.С. Вы увидели изменение экспрессии гена IPT, который кодирует изопентенилтрансферазу?

Ответ: Он не выявлялся среди тех генов, которые больше всего показывали изменение экспрессии, однако наши соавторы измеряли его экспрессию и да, она меняется во время развития клубенька.

Вопрос д.б.н. Шишовой М. Ф. Вы делали транскриптомный анализ на нескольких стадиях развития клубенька, и Вы делали иммулокализацию цитокинина, опять же, в

разных зонах на разных стадиях развития. Скажите, пожалуйста, если брать общую группу, хоть как-то связанную с цитокинином, были ли такие гены характерные для какого-то определенного этапа развития? И не было ли какого-то временного сдвига: что сначала менялась экспрессия, потом происходило накопление цитокинина или это были согласованные изменения?

Ответ: Нет, эти гены есть в транскриптоме, но нельзя сказать, что какая-то конкретная стадия оказывается посвящена одному процессу.

Вопрос к.б.н. Демченко К.Н. Что Вы пытались показать на тепловых картах (слайд 9), количество меняющихся генов или их уровни?

Ответ: Количество изменяющихся генов.

На заседании 13 апреля 2023 г. диссертационный совет принял решение за высококвалифицированное выполнение научного исследования и успешное решение научной задачи, имеющей значение для развития физиологии и биохимии растений присудить Кусакину П.Г. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек (10 очно, 6 удаленно), из них 7 докторов наук (4 очно, 3 удаленно) и 1 кандидат биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящего в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек проголосовали: за 16, против 0.

И.о. Председателя диссертационного совета

д.б.н.

Шнеер Виктория Семеновна

Ученый секретарь диссертационного совета

д.б.н.

Лянгузова Ирина Владимировна

13.04.2023