



УТВЕРЖДАЮ

Директор ФИЦ КазНЦ РАН

Синяшин О.Г.

25 октября 2019 г.

## ОТЗЫВ

официального оппонента Гоголева Юрия Викторовича на диссертацию Серовой Татьяны Александровны по теме: «Молекулярно-генетические и физиологические механизмы старения симбиотического клубенька гороха посевного (*Pisum sativum* L.)», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений

### **Актуальность темы исследования**

Работа Серовой Татьяны Александровны посвящена исследованиям молекулярно-генетических и физиологических механизмов старения симбиотических клубеньков у гороха посевного. Горох посевной является излюбленным объектом как генетики, так и физиологии растений. Поэтому выбор объекта исследований представляется очень удачным. Хотя старение клубенька является естественным процессом, его отсрочка, вероятно, приведет к продлению процесса азотфиксации, а значит увеличит поступление азота в растения. Благодаря этому поставленная в диссертационной работе цель представляется весьма актуальной как для фундаментальных исследований, так и сельскохозяйственной практики, а сформулированные 5 задач являются адекватными для ее достижения.

### **Научная новизна исследования**

В представленной диссертационной работе был проведен комплекс исследований, который позволил выявить гены, активирующиеся во время старения в симбиотических клубеньках, а также показал позитивную роль этилена в регуляции старения и негативную роль гиббереллинов в этом процессе. Данные результаты были получены соискателем впервые.

## **Значимость для науки полученных результатов**

В работе рассматривается роль различных фитогормонов в старении клубеньков бобовых. Для этилена и гиббереллинов предложены схемы их действия как при естественном старении, так и старении, индуцированном симбиотическими мутациями в генах растения. Обсуждается универсальность реакции старения клубеньков при их неэффективности. До настоящего времени подобная роль старения клубеньков в контроле процессов, связанных с биологической фиксацией азота, не рассматривалась. Таким образом, полученные результаты вносят весомый вклад в наши представления о молекулярно-генетических и физиологических механизмах старения симбиотических клубеньков.

## **Структура и содержание работы**

Диссертация изложена на 181 странице машинописного текста, иллюстрирована 51 рисунком и 5 таблицами в основном тексте диссертации и 4 рисунками и 1 таблицей в Приложении. Рукопись построена по традиционному плану и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Публикации по теме диссертации», «Список литературы», «Приложение» и «Благодарности».

В разделе «Введение» приведено логичное обоснование актуальности изучаемой проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, научно-практическое значение. Формулируются 4 положения, выносимых на защиту.

Раздел «Обзор литературы» написан прекрасным литературным языком и состоит из трех разделов. Первый раздел вводит читателя в мир симбиотических клубеньков. В сжатой форме приводятся основные этапы развития клубенька. Во втором разделе дается исчерпывающая сводка современной литературы, посвященной старению клубеньков. Приводятся описание морфологических признаков старения клубеньков, данные о роли различных протеаз, особое внимание уделяется гормональной регуляции данного процесса. Отдельно рассматривается индуцированное старение. В третьем разделе читатель кратко знакомится с методом лазерной микродиссекции, активно используемым диссертантом. В заключении к обзору суммируются как достижения, так и белые пятна в изучении старения симбиотических клубеньков.

В разделе «Материалы и методы» дано детальное описание использованного растительного материала, который включал серию линий дикого типа и полученных на их основе мутантов по симбиотическим признакам, а также использованный в работе штамм ризобий. Детально рассмотрены молекулярно-биологические методы, включая выделение РНК, ПЦР в реальном времени, лазерную микродиссекцию, а также микроскопические методы, включая иммунолокализацию и лазерную сканирующую конфокальную микроскопию.



Использованный богатый арсенал современных методов обеспечил адекватное решение поставленных задач.

В разделе «Результаты исследований» приводятся данные по анализу экспрессии генов гороха, ассоциированных со старением, как на уровне целых клубеньков, так и на уровне отдельных клеток, вырезанных из образцов с помощью лазерной микродиссекции. Эти исследования были выполнены с использованием мутантов, полученных на трех различных генотипах гороха. Данные по анализу экспрессии были дополнены иммулокализацией предшественника биосинтеза этилена – 1-аминниклопропан-1-карбоновой кислоты и активной формой гиббереллинов – ГА<sub>3</sub>. Растения также обрабатывались экзогенной ГА<sub>3</sub>.

В разделе «Обсуждение результатов» проводится детальный анализ полученных в ходе выполнения диссертационной работы результатов и литературных данных. Обсуждается возможность использования проанализированных генов, ассоциированных со старением, как молекулярных маркеров старения клубеньков.

Представленные выводы достоверны и в достаточной степени подтверждены результатами.

Список литературы представлен 306 источниками, из которых 12 на русском языке. Оформление списка литературы полностью соответствует ГОСТу.

По результатам исследований диссертантом опубликовано 12 тезисов, что отражает хорошее представление результатов на отечественных и международных научных конференциях, а также 4 статьи в журналах из списка изданий, рекомендованных ВАК.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Результаты диссертационного исследования Т.А. Серовой могут быть использованы для чтения лекций и проведения практикумов по физиологии растений, системной биологии, симбиологии. В случае дальнейшего развития исследований они могут послужить для оптимизации протоколов иммулокализации и транскриптомного анализа на основе микровысечек; некоторые положения будут востребованы для составления рекомендаций по использованию биопрепаратов клубеньковых бактерий.

#### **Замечания к работе**

В данном случае формальные замечания к оформлению рукописи и языковым погрешностям не являются уместными. Однако, к диссертанту есть некоторые вопросы к проведению ПЦР-анализа. Прежде всего, в описании методов и результатов рецензенту не удалось обнаружить сведений о проведении контроля на

эффективность обработки ДНК-азой. Проводилась ли проверка на остаточную ДНК, в частности, в отрицательных пробах с референсным геном без добавления ревертазы. Кроме того, в рукописи отсутствуют сведения об обоснованности использования в качестве референсного гена *PsGapC1*. Проводилась ли проверка уровня его стабильности в использованных объектах и в изучаемых физиологических условиях по сравнению с другими стандартными референсными генами. В противном случае, делать выводы на основании полутора-двукратных отличий активности некоторых генов (стр. 83 – *PsCyp15a*, *PsTPP*, *PsATB2*, и др.) следует с известной долей осторожности.

Высказанные замечания не влияют на принципиальные выводы работы, а имеют целью уточнение некоторых методических моментов.

### **Заключение**

Таким образом, работа Серовой Татьяны Александровны «Молекулярно-генетические и физиологические механизмы старения симбиотического клубенька гороха посевного (*Pisum sativum* L.)», представленная на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений, является законченной научно-квалификационной работой, полностью соответствующей критериям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор, Серова Татьяна Александровна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

24.10.2019

Главный научный сотрудник  
лаборатории молекулярной биологии  
Казанского института биохимии и биофизики –  
обособленного структурного подразделения  
Федерального исследовательского центра  
«Казанский научный центр Российской академии наук»,  
доктор биологических наук

 Ю.В. Гоголев

Россия, Республика Татарстан.

420088 г. Казань, ул. Академика Арбузова, д. 8, Литера Р

тел.: +7 (843) 2319036; e-mail: gogolev.yuri@gmail.com

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное  
подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
«Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской  
академии наук»

<http://www.kibb.knc.ru/>