

«УТВЕРЖДАЮ»

Ио директора Института биохимии и
генетики – обособленного
структурного подразделения
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
Уфимского федерального
исследовательского центра
Российской академии наук, д.б.н.,
профессор, чл.-корр. РАО



Э.К. Хуснутдинова

Октябрь 2019 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу соискателя Серовой Татьяны Александровны «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 диссертации

Эффективная фиксация атмосферного азота бобовыми растениями в симбиозе с клубеньковыми бактериями представляет особый интерес. Поскольку химические азотные удобрения, применяемые обычно в качестве источника азота в сельском хозяйстве, могут быть вредны с точки зрения экологии и их производство требует значительных затрат энергоресурсов. Одним из направлений улучшения совокупной продуктивности симбиотической фиксации азота является отсрочка старения симбиотического клубенька. Регуляция старения клубенька является сложным многоступенчатым процессом, осуществляемым на генетическом и гормональном уровнях, с привлечением работы многих генов, активация или репрессия которых в конечном итоге приводит к естественному отмиранию этого временного органа бобовых. Понимание этого сложного механизма позволит управлять процессом старения клубенька и тем самым увеличить биологическую продуктивность растений.

В связи с вышеизложенным, тема диссертационной работы Серовой Татьяны Александровны, посвященной исследованию механизмов старения симбиотического клубенька гороха посевного, несомненно, является актуальной.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Серовой Т.А. построена по традиционной схеме и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение, заключение, выводы, публикации по теме диссертации, список литературы, приложение и благодарности. Текст изложен на 181 странице, содержит 5 таблиц (+1 в «Приложении») и очень хорошо проиллюстрирован - 51 рисунок (+4 в «Приложении»). Список использованной литературы включает 306 источников, что свидетельствует о глубокой и обширной проработке автором литературы по изучаемой проблеме. Название работы отражает её содержание.

Во «**Введении**» автор кратко обосновывает актуальность, оценивает степень разработанности темы работы, формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, формулирует положения, выносимые на защиту. Затем следует информация о личном вкладе соискателя в представляемую работу, оценивается степень достоверности и представляются сведения об апробации результатов диссертационной работы. Оценив информацию можно сделать заключение, что задачи исследования соответствуют поставленной цели. Положения, выносимые на защиту, согласуются с темой диссертационного исследования и полностью отвечают поставленной цели и задачам.

Глава «**Обзор литературы**» состоит из трех основных частей. В первой части, состоящей из 6 разделов, рассматривается современное представление о развитии симбиотического клубенька. Отдельно рассматриваются стадия преинфекции, сигнальный каскад, активируемый Nod-факторами, стадия инфекции, формирование примордия клубенька и инфицирование клеток примордия клубенька ризобиями. Здесь же сравнивается гистологическая организация недетерминированного и детерминированного клубеньков.

Во второй части обзора обобщены литературные данные, касающиеся старения симбиотического клубенька. Приведены морфологические признаки старения симбиотического клубенька, описаны протеазы, участвующие в данном процессе. Большое внимание уделено фитогормональной регуляции развития симбиотического клубенька – отдельными подглавами описано участие в этом процессе этилена, абсцизовой кислоты, жасмонатов, монооксида азота и гиббереллинов. Здесь же обобщены данные об окислительном стрессе при старении симбиотического клубенька, приведены современные знания о генетическом контроле старения симбиотического клубенька и описано старение клубенька, индуцированное стрессом.

Третья, короткая (2 стр.) часть обзора описывает перспективы лазерной микродиссекции в изучении растительно-микробных взаимодействий.

В конце главы для удобства читателя автор обобщает приведённые в обзоре сведения в виде краткого заключения.

В методической части работы дана характеристика растительных материалов и бактериальных штаммов, а также описаны условия их выращивания. На 15 страницах приведено краткое, но достаточно информативное описание, в общей сложности, 15 методик. Разнообразие и охват от микробиологических и физиологических до самого широкого спектра современных молекулярно-биологических методов, примененных в процессе работы над диссертационной работой, свидетельствует о комплексном подходе к решению поставленных задач и характеризует соискателя как квалифицированного экспериментатора. Описаны молекулярно-биологические методы: выделение РНК и элюция ДНК из геля, дизайн праймеров для ПЦР, ОТ-ПЦР, относительный ПЦР-анализ в режиме реального времени, секвенирование ДНК. Подробно описаны методы лазерной микродиссекции и экспрессионного анализа образцов. Особо хочется отметить прекрасное владение соискателем методом иммунолокализации, позволившее получить качественные иллюстрации к работе.

Результаты исследований изложены очень подробно, структурированно, с представлением таблиц и наглядных иллюстраций. Первая подглава, состоящая из двух основных подразделов описывает анализ экспрессии генов, ассоциированных со старением, в клубеньках *P. sativum* дикого типа и мутантов, блокированных на различных стадиях развития симбиоза. В первой части, в модельной системе на основе генотипов Sparkle и Sprint, описаны результаты сравнения экспрессии генов, кодирующих цистеиновые протеазы 1 и 15a (PsCyp1, PsCyp15a), тиоловую протеазу (PsTPP), фактор транскрипции bZIP (PsATB2), 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат синтазу (PsACS2), 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат оксидазу (PsACO1), альдегид оксидазу (PsAO3) и ГА 2-оксидазу (PsGA2ox1). Во второй части приведены результаты анализа экспрессии этих же генов, ассоциированных со старением, за исключением ГА 2-оксидазы и добавлением гена начального этапа биосинтеза АБК 9-цис-эпоксикаротеноид диоксигеназы (PsNCED2) в клубеньках *P. sativum* в модельной системе на основе генотипа SGE.

Вторая подглава в трех разделах описывает результаты анализа экспрессии генов, ассоциированных со старением, в инфицированных клетках зоны азотфиксации и зоны старения у клубеньков дикого типа и мутантов, характеризующихся ранним старением клубеньков, полученные с применением метода лазерной микродиссекции.

В третьей подглаве приведены данные исследований иммунолокализации предшественника этилена, 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК), в клубеньках *P. sativum* дикого типа и мутантов, блокированных на различных стадиях развития симбиоза в модельных системах на основе генотипов Sparkle, Sprint-2 и SGE.

Четвертая подглава описывает результаты анализа экспрессии генов ГА 20-оксидазы (PsGA20ox1) и ГА 2-оксидазы (PsGA2ox1), кодирующих ферменты метаболизма гиббереллинов, в клубеньках *P. sativum* родительской линии SGE и полученных на ее основе мутантов, блокированных на различных стадиях развития симбиоза.

Краткая пятая подглава посвящена анализу экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма гиббереллинов, в инфицированных клетках зоны азотфиксации и зоны старения у клубеньков родительской линии SGE и мутанта SGEFix--7 (Pssym27).

Анализ иммунолокализации гиббереллина (ГА₃) в клубеньках *P. sativum* родительской линии SGE и полученных на ее основе мутантов, блокированных на различных стадиях развития симбиоза описан в подглаве 6.

В последней, седьмой подглаве описаны результаты анализа влияния экзогенной обработки ГА₃ на развитие растений и клубеньков дикого типа SGE. Приведены результаты количественной оценки клубенькообразования и гистологической организации клубеньков, а также анализ экспрессии генов, ассоциированных со старением и кодирующих ферменты метаболизма ГА, в клубеньках у контрольных и обработанных экзогенной ГА₃ растений линии SGE.

Обсуждение результатов позволило автору обобщить материалы и сделать обоснованные выводы. В первой части автор, рассматривая гены цистеиновых протеаз как маркеры старения симбиотического клубенька *P. sativum*, пришел к заключению о важности роли цистеиновой протеазы 15A и тиоловой протеазы в процессе старения симбиотического клубенька *P. sativum*. Автор предположил, что обнаруженный высокий уровень сигналов от транскриптов *PsCyp15a* и *PsCyp1* в зоне старения у клубеньков, формируемых в результате взаимодействия с мутантным штаммом B6b1, может быть следствием более быстрого старения в неэффективных клубеньках.

Во второй части обсуждения, автор, сравнивая данные, полученные при изучении экспрессии гена *PsATB2*, кодирующего фактор транскрипции bZIP, с ранее полученными результатами на *M. truncatula* приходит к выводу, что активность данного гена может служить маркером старения симбиотического клубенька *P. sativum*.

В третьей части обсуждается роль фитогормонов в регуляции старения симбиотического клубенька *P. sativum*. На основании сопоставления собственных результатов с литературными данными высказано предположение о возможном участии АБК и этилена в позитивной регуляции старения симбиотического клубенька *P. sativum*. Полученные результаты, свидетельствующие о снижении экспрессии генов, ассоциированных со старением, замедление формирования зоны старения и развитие обширной зоны азотфиксации в клубеньках линии SGE, обработанных экзогенной гибберелловой кислотой, свидетельствуют об участии гиббереллинов в задержке старения симбиотического клубенька, а также о вовлечении гиббереллинов в функционирование зрелого клубенька *P. sativum*.

В третьей части обсуждаются различия в характере экспрессии генов, ассоциированных со старением, в клубеньках *P. sativum* разных родительских линий. В четвертой, последней части, проведено обсуждение анализа экспрессии генов, ассоциированных со старением, в клубеньках мутантных

линий *SGEFix-2 (Pssym33)* и *Sprint-2Fix (Pssym31)*. В конце главы «Обсуждение» представлено обобщающее заключение.

Выводы работы четко сформулированы и соответствуют цели и задачам исследования.

Автореферат диссертации полностью отражает структуру и основное содержание работы. По теме диссертационной работы автором опубликовано 12 работ, в том числе 4 статьи в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science или рекомендованных ВАК МОН РФ. Результаты промежуточных этапов исследований обсуждались на научных конференциях, в том числе международных. В публикациях полностью отражены основные результаты и выводы диссертационной работы.

Научная новизна работы

Серовой Т.А. впервые определена локализация АЦК, являющейся предшественником этилена, в клубеньках *P. sativum*, показана позитивная роль этилена в старении симбиотического клубенька *P. sativum* и функционировании его меристемы. Впервые показана универсальность старения, индуцированного мутациями в геноме макросимбионта, как реакции на неэффективность симбиоза. Впервые на транскрипционном уровне показана позитивная регуляция старения симбиотического клубенька *P. sativum* АБК. Впервые проведен комплексный анализ влияния экзогенной ГАЗ на развитие и функционирование симбиотических клубеньков растений *P. sativum*. Доказана негативная роль гиббереллинов в процессе старения симбиотического клубенька, показано их участие в функционировании меристемы клубенька. Выявлены гены (*PsCyp15a*, *PsTPP*, *PsATB2*, *PsGA2ox1*, *PsACO1*, *PsNCED2* и *PsAO3*), снижение экспрессии которых может привести к отсрочке старения.

Значимость полученных результатов для развития физиологии и биохимии растений

Результаты диссертационной работы Серовой Т.А. вносят существенный вклад в понимание молекулярно-генетических и гормональных механизмов регуляции процесса старения симбиотического клубенька *P. sativum* и бобовых растений в целом. Так, продемонстрировано, что старение симбиотического клубенька является универсальной реакцией на его неэффективность, индуцированную мутациями в генах макросимбионта. Результаты работы Серовой Т.А. являются важным шагом в разработке теоретических основ селекции бобовых культур с поздним наступлением старения симбиотического клубенька, обеспечивающим оптимальный период активной фиксации азота.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Результаты исследования, изложенные в диссертационной работе Серовой Татьяны Александровны, могут быть использованы для разработки технологий экзогенной обработки корневых систем бобовых культур ГАЗ, что может привести к продлению сроков азотфиксации клубеньков. Диссертанткой в соавторстве с руководителем разработаны научно-методические рекомендации по лазерной микродиссекции отдельных клеток или их групп из симбиотических структур бобовых, а также выделение из них нуклеиновых кислот (ДНК/РНК) для дальнейшего анализа. Кроме того, результаты исследования представляют интерес для специалистов смежных областей (микробиологов, молекулярных биологов, генных инженеров и др.), а также могут быть использованы при чтении спецкурсов на факультетах биологического профиля в ВУЗах.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации и результаты проведенного исследования соответствуют паспорту научной специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Общие замечания по работе

Диссертационная работа Т.А. Серовой «Молекулярно–генетические и физиологические механизмы старения симбиотического клубенька гороха посевного (*Pisum sativum* L.)» вызывает очень хорошее впечатление: грамотно спланирована, выполнена на самом высоком методическом уровне с привлечением обширного спектра методов и подходов. Достоверность результатов, обоснованность выводов, глубина проработки и обсуждения научных публикаций, широкий кругозор автора не вызывают сомнений. Тем не менее, структура и текст диссертации не лишены некоторых недостатков. Так, из стройной структуры работы выбивается часть, касающаяся разработки методов микродиссекции клубеньков. Логичным представляется подача данного материала в разделе методик и результатов исследований, а вывод переделать в практические рекомендации. Также глава «Обсуждение» выбивается из четкой нумерации глав отдельным списком подглав, что нарушает эстетику подачи работы. Встречаются неудачные выражения, такие как «Реакцию секвенирования ДНК проводили с использованием генетического анализатора».

Заключение

Диссертационная работа Серовой Татьяны Александровны «Молекулярно–генетические и физиологические механизмы старения симбиотического клубенька гороха посевного (*Pisum sativum* L.)», является оригинальной, самостоятельно выполненной, законченной научно-квалификационной работой, представляющей значительный научно-практический интерес, содержит решение актуальной научной задачи,

имеющей существенное значение для физиологии и биохимии растений - исследование механизмов старения азотфиксирующего клубенька гороха посевного.

Диссертация соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Отзыв утвержден на основании коллективного обсуждения диссертации на научном семинаре лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (Протокол № 12 от 18.10.2019).

Сведения о составителе отзыва: доктор биологических наук, заведующий лабораторией биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Баймиев Алексей Ханифович

Подпись Ал.Х. Баймиева заверяю:
Ио зам. директора по научной работе
ИБГ УФИЦ РАН, д.б.н.



А.С.Карунас

22.10.2019 г.

450054, г. Уфа, проспект Октября, 71
Тел. (347)235-60-88
e-mail: molgen@anrb.ru