

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу **Цыгановой Анны Викторовны** «Симбиотический интерфейс в развитии клубеньков *Pisum sativum* L. и *Medicago truncatula* Gaertn.», представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений

Формирование единой симбиотической системы из растительного организма и бактерий, способных фиксировать атмосферный азот, - процесс, который привлекает внимание исследователей на протяжении столетий. При этом несомненна возрастающая актуальность его изучения. Она связана как с использованием этой «раскрученной» модельной системы для понимания фундаментальных принципов взаимодействия растений и микроорганизмов, так и с необходимостью установления конкретики механизмов трансформации неорганического компонента биосферы в органический. Важнейшим аргументом в определении актуальности исследований в этой области исследований служит их необходимость для реализации практических задач сельского хозяйства, связанных со снижением потребности в азотных удобрениях и повышением «белковости» продукции растениеводства.

Последние десятилетия отмечены бурным развитием новых методических подходов в биологии, в целом, и в анализируемой области, в частности. Различные «омиксные» исследования, формируя масштабную и объективную картину изменений, происходящих в ходе реализации различных процессов, позволили существенно продвинуться и в понимании событий, обеспечивающих прохождение различных стадий взаимодействия растений и ризобий, выявить ряд важных молекулярных игроков. Дополнительный инструментарий сформировался благодаря получению многочисленных мутантов, имеющих охарактеризованные фенотипы с модификацией различных этапов развития клубенька. Вместе с тем остаются слабо охарактеризованными процессы, происходящие в клеточной стенке – важнейшем компартменте растительной клетки и ключевом компоненте интерфейса между клетками растений и бактерий, который претерпевает, судя по морфологии различных структур, создаваемых на разных стадиях формирования и функционирования азот-фиксирующих клубеньков, существенные и необычные видоизменения. Недостаток сведений о процессах в клеточной стенке, происходящих при взаимодействии с ризобиями, объясняется сложностью организации этой многокомпонентной структуры и сопряженными трудностями в её характеристике, а также все ещё существующей недооцененностью клеточной стенки как компартмента, выполняющего многочисленные функции и непосредственно диктующего многие события морфогенеза и сигналинга в растении. Поэтому диссертационная работа А.В. Цыгановой, направленная на изучение событий, происходящих в клеточной стенке, и факторов, на них влияющих, в ходе развития бобово-ризобиального симбиоза, несомненно актуальна.

Диссертационная работа состоит из введения, трех глав (обзор литературы, описание использованных материалов и методов, изложение основных результатов исследований и их обсуждение), общего заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Последний состоит из 767 источников, из которых 748 англоязычные. Общий объем диссертации составляет 341 страниц, самая большая глава «Результаты и их обсуждение». Введение содержит все необходимые элементы, дающие понимание актуальности исследования, его цели и задач, новизны, научно-практической значимости, основных положений работы, публикационной активности автора и апробации результатов. В обзоре литературы приводятся имеющиеся представления о последовательных стадиях инфекционного процесса; сведения изложены на современном клеточно-молекулярном уровне. Обзор хорошо иллюстрирован, подытожен обоснованием необходимости дальнейшего исследования развития симбиотического интерфейса и создаёт обстоятельную базу для восприятия научных результатов диссертанта.

В главе «Материал и методы» дано описание как основных объектов исследований и подходов к отбору проб для анализа, так и методических аспектов различных вариантов микроскопии, использованных в работе, включая статистическую обработку результатов иммуномечения. Изложение материалов главы проведено, в целом, с адекватной степенью детальности. О профессионализме автора во владении разнообразными методами микроскопии свидетельствует и надежность совокупности использованных контролей, и качество многочисленных микрофотографий, приведённых в диссертационной работе. Несколько неожиданно выглядит то, что некоторые проводки для обезвоживания образца начинаются с 50% спирта (стр. 99), что может вызывать слишком резкий перепад в оводненности клеток и приводить к нарушению их структуры. В качестве замечания к этому разделу следует отметить отсутствие информации о параметрах съёмки при различных видах микроскопии; в том числе, практически нигде не указаны длины волн, при которых проводился анализ.

Глава «Результаты и их обсуждение» содержит впечатляющий объём фактического материала. Начинается раздел с очень уместного описания гистологической и ультраструктурной организации азотфиксирующих клубеньков у исследуемых видов растений - *P. sativum* и *M. truncatula*, а также многочисленных симбиотических мутантов, в которых нарушены различные стадии взаимодействия бактерий и хозяина. В дальнейшем приведены данные, полученные с использованием большого набора различных антител, специфичных к эпитопам полисахаридов, гликопротеинов, растительных гормонов и ряда других «адресатов». Всё это проанализировано на разных стадиях взаимодействия ризобий и растения. Хотя основной акцент работы обоснованно ставится на анализ структур, непосредственно связанных с развитием инфекционного процесса, проведенные исследования выявили существенные изменения в стенке растительной клетки у некоторых использованных мутантов в сравнении с исходными генотипами. Мне кажется, что эти

данные могли бы стать предметом более детального рассмотрения или даже отдельной главы в описании результатов работы.

В качестве несомненного достоинства работы следует отметить развернутый список использованных в исследованиях антител на различные эпитопы сложных углеводов. Он почти исчерпывающ, если иметь в виду перечень имеющихся в мире вариантов, специфичность которых к конкретным участкам полимеров растительной клеточной стенки охарактеризована с разумной степенью адекватности. Пожалуй, имело бы смысл добавить к нему лишь антитела INRA-RU1 или INRA-RU2 (Ralet et al., 2010), которые существенно активнее и специфичнее взаимодействуют с остовом рамногалактуронана I, чем CCRC-M35 или CCRC-M36, а также антитело LM26 (Torode et al., 2018), хорошо выявляющее цепи β -1,4-галактана, разветвленные в положении O(6); такие галактаны часто встречаются, но остаются незамеченными для использованного в работе антитела LM5, «нацеленного» на линейные участки цепи.

Особую ценность работе придаёт количественная оценка распределения метки на электрономикроскопических снимках. Числовые выражения, сопровождаемые статистической обработкой и сведённые в одну таблицу для многочисленных вариантов, существенно обогащают картину, сформированную на основе микрофотографий, и делают её более убедительной. Такая количественная оценка осуществлена для характеристики распределения некоторых пектинов, арабиногалактановых белков, глутатиона, гибберелинов. Жаль, что при анализе распределения эпитопов пяти различных антител, связывающихся с гомогалактуронаном, подсчеты плотности метки на микрофотографиях приведены только для LM5 и отсутствуют для других антител, причем представлены только для стенок инфекционных нитей, но не для «обычных» стенок растительных клеток.

Безусловный интерес представляют данные, полученные при анализе различных симбиотических мутантов, и их сравнении с растениями исходного генотипа. Так, в мутантах *P. sativum* по ортологичным генам *Sym33* и *IPD3* выявлено существенное обогащение клеточных стенок меткой на ксилогалактуронан и полисахарид, содержащий феруловую кислоту. У мутанта RisFixV (*sym42*) деградирующие бактериоды в зоне старения были окружены отложениями деэтерифицированного пектина. У мутанта TR3 (*ipd3*) *M. truncatula*, который характеризуется аномальным ростом инфекционных нитей внутри клубенька и отсутствием выхода бактерий, изменялось распределение деметилированного гомогалактуронана в инфекционной нити.

Несомненный интерес представляют данные о характере распределения сложных гликанов в растущей инфекционной нити. При внешнем сходстве с апикальным ростом таких структур как пыльцевая трубка и корневой волосок, удлинение инфекционной нити имеет, как справедливо отмечается в диссертации, другие механизмы и движущие силы. Удивительным образом инфекционная нить врастает внутрь тургесцентной растительной клетки. Все органеллы, участвующие в создании клеточной стенки и ряда других

компонентов инфекционной нити, расположены за её пределами, в цитоплазме растительной клетки. Вероятно, в отсутствие тургорного давления в формируемой нити минимизированы процессы растяжения, и основу её продвижения составляет добавление нового материала к растущему кончику. С этим может быть связано отсутствие, точнее невыявление, в ней ксилоглюкана, который считается неперенным участником процесса растяжения уже отложенных клеточных стенок. Отсутствие связывания эпитопов ксилоглюкана, обнаруженное для одного из двух проанализированных видов, может объясняться и процессами маскировки другими полимерами. Эта возможность упоминается в диссертации. Поскольку маскировку обычно связывают с гелеобразующими полисахаридами, в данном случае гомоалактуронаном, рационально было бы провести обработку срезов полигалактуроназой, чтобы снять этот вопрос.

Последующие разделы в главе, описывающей результаты работы, посвящены характеристике внутренних компонентов инфекционной нити и симбиосом. Среди них хорошо выявляются арабиногалактановые белки. Некоторые их эпитопы охарактеризованы как маркёры дифференцировки симбиосомных мембран. Проанализировано распределение и некоторых низкомолекулярных соединений, которые могут играть важную роль в развитии симбиосом: перекиси водорода, глутатиона, растительных гормонов различных классов. Показана связь локализации и распределения этих соединений со стадиями развития симбиотического клубенька у *P. sativum*.

Завершается работа общим обсуждением результатов (заключением), выводами и списком литературы. Сформированы обобщающие таблицы и рисунки, характеризующие работу в целом. Заключительная схема, суммирующая результаты, служит несомненным украшением работы, однако некоторые её элементы сложны для восприятия, в частности те, которые изображают строение инфекционной нити.

Как и практически любая сложная, значительная по объёму работа, диссертация не свободна от недостатков. Основной проблемой рецензируемой работы служит то, что она полностью основана только на использовании методов микроскопии. Это существенно ограничивает обстоятельность выводов, которые позволительно делать по представленным результатам. Вместе с тем, следует отметить, что исследование динамики клеточной стенки в ходе различных физиологических процессов сложно, и набор применимых подходов крайне лимитирован. Особенно это касается локально реализуемых процессов, для которых часто просто невозможно корректно выделить образцы для биохимического или молекулярно-генетического анализа. К таковым, безусловно, относится взаимодействие микроорганизмов с тканями растений, для понимания тонких механизмов которого необходим постадийный анализ точечных изменений в клеточной стенке. В этих условиях, анализ с использованием иммуноцитохимии - наиболее адекватный подход, тем более, если он осуществлён в таком объёме и с таким качеством полученных иллюстраций, как в оппонируемой работе, а выводы делаются с учётом ограничений, диктуемых параметрами использованных методик. Тем не

менее, хотя бы обсуждение данных следовало построить с бОльшим привлечением данных, полученных с использованием гетерологичных подходов, например, транскриптомики, хотя их интерпретация также имеет свои ограничения.

К числу недочётов диссертации следует отнести недостаточно обоснованное использование терминов, характеризующих параметры механических свойств клеточной стенки. Так, термин «ригидность» фигурирует в нескольких выводах и положениях, выносимых на защиту (например, на стр. 13 «Показано усиление ригидности стенки инфекционной нити...»), или на стр. 276 «характеризуются различными проявлениями защитных реакций, приводящих к увеличению ригидности клеточной стенки»), а также в тексте раздела, описывающего результаты работы. При этом никаких анализов этой физической величины, выражаемой в конкретных физических единицах, в работе не осуществлялось.

Не всегда чётко прослеживается логика выбора объектов для анализа, в частности, - разнообразных мутантов. Вероятно, рационально было бы в сводной таблице, перечисляющей использованные растительные объекты в разделе «Материалы и методы», дополнительно привести наименование продукта, кодируемого изменённым геном, и обозначение аргументов для использования конкретных мутантов в работе. Это значительно облегчило бы восприятие текста и помогло чётче выявить замысел автора. Альтернативным вариантом могло бы быть обсуждение наблюдаемых особенностей иммуномечения в большей привязке к возможным механизмам возникновения этих эффектов, имея в виду конкретный изменённый ген.

Неудачно, с моей точки зрения, сформулировано положение 7, выносимое на защиту, о наличии влияния гормонов на образование симбиотической мембраны. Оно выглядит слишком общим и даже тривиальным, учитывая, например, что посвящённый этой тематике раздел обзора литературы начинается с фразы «Гормоны растений регулируют все процессы развития, включая формирование клубеньков» (стр. 71).

При детальной характеристике в разделе «Материал и методы» нескольких вариантов пробоподготовки для электронной микроскопии (рутинная, с низкотемпературной заливкой, с использованием микроволнового излучения или замораживания при высоком давлении) описание конкретных полученных результатов не содержит указания на применённый вариант обработки образцов.

В работе имеется ряд технических погрешностей. Например, названия ферментов, таких как пектатлиаза и пектинметилэстераза, в русскоязычном варианте принято писать слитно, в то время как в тексте диссертации они написаны либо в два слова, либо через дефис. Не всегда полны и удачно сформулированы подписи к рисункам и таблицам. Например, таблица 10 (стр.250) называется «Распределение частиц золота в 2-недельных клубеньках *P. sativum* дикого типа SGE и мутанта SGEFix—3 (sym26)».

Встречаются многочисленные терминологические неточности, касающиеся описания строения полисахаридов и гликопротеинов. Ксилоглюкан, содержащий в повторяющемся звене остаток фукозы, называется, согласно правилам биохимии углеводов, «фукозилированный ксилоглюкан», а не «фукозиловый ксилоглюкан», как повсеместно используется в обзоре литературы. К остову рамногалактуронана I могут быть присоединены арабиновые, а не арабиновые (стр. 48, 49, 142) и уж тем более не фукозиловые (стр. 48, 142) боковые цепи; последние не только неправильно названы, но и, насколько мне известно, необоснованно приписаны пектинам, поскольку сведений об их существовании нет, в соответствии с чем они не представлены в обзоре литературы на обобщающей схеме строения пектинов (рис. 13, стр. 47). Белковый остов арабиногалактановых белков (как и любых других белков) содержит С-концевой, а не С-конечный (стр. 51) домен. Ксилоглюкан содержит целлотетраозные, а не целлотетрозные (стр. 155) блоки.

Тем не менее, характеризуя в целом диссертационное исследование, следует отметить, что экспериментальная работа выполнена на высоком методическом и техническом уровне. Несомненны актуальность и новизна работы. Получен обширный объём уникальных данных о модификации стенки растительной клетки на разных стадиях формирования бобово-ризобиального симбиоза и в проанализированной коллекции симбиотических мутантов. Сформулированы весомые положения, выносимые на защиту. Выводы, сделанные автором, обоснованы, вытекают из основных разделов диссертации и соответствуют поставленным задачам.

Работа Анны Викторовны Цыгановой обстоятельно апробирована на многочисленных конференциях в России и за рубежом. Результаты исследований представлены в 30 статьях, значительная часть которых опубликована в престижных журналах первого квартала. Более чем в половине статей А.В. Цыганова является первым автором. Автореферат хорошо отражает содержание диссертации.

Полученные автором экспериментальные результаты и сформулированные теоретические положения могут быть рекомендованы к использованию при чтении курсов лекций по физиологии растений и специализированных курсах, посвященных взаимодействию растений с другими организмами, в высших учебных заведениях биологического и сельскохозяйственного профилей. Материалы диссертации представляют интерес для исследовательской работы, проводимой в ФГБУН Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ФГБУН Ботанический институт имени В. Л. Комарова РАН, ФГБУН Казанском институте биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, на кафедре физиологии растений МГУ им. М.В. Ломоносова и на кафедре физиологии и биохимии растений СПбГУ, в Российском государственном аграрном университете – МСХА имени К.А. Тимирязева, в ФГБУН Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений.

Изложенное позволяет сделать заключение, что диссертация Цыгановой Анны Викторовны «Симбиотический интерфейс в развитии клубеньков *Pisum sativum* L. и *Medicago truncatula* Gaertn.», является законченным научно-квалификационным трудом, совокупность результатов которого можно классифицировать как новое крупное научное достижение, связанное с пониманием фундаментальных процессов формирования бобово-ризобиального симбиоза. По актуальности, объему проделанной экспериментальной работы, ее качеству, новизне и научно-практической значимости полученных результатов диссертация соответствует требованиям ВАК Министерства образования и науки РФ (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Цыганова Анна Викторовна, заслуживает присвоения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений.

Главный научный сотрудник, зав. отделом
Казанского института биохимии и биофизики –
обособленного подразделения Федерального
исследовательского центра «Казанский научный
центр Российской академии наук»,
доктор биологических наук, профессор



Горшкова Т. А.

Г.н.с., д.б.н., проф. Горшкова Татьяна Анатольевна
КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, 420111 г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31. 8-(917) 273-95-57. E-mail:
gorshkova@kibb.knc.ru

Подпись Горшковой Т. А. заверено.
Главной ученой секретарь ФИЦ КазНЦ РАН
к.х.н. Зиганшина С.А.

