

## Сведения о результатах публичной защиты

**Зорин Евгений Андреевич**

Диссертация «Анализ дифференциальной экспрессии генов при образовании азотфиксирующих клубеньков и арбускулярной микоризы у *Pisum sativum* L.»

**Зам. Председателя** д.б.н. Цыганов Виктор Евгеньевич.

**Присутствовали:** д.б.н. Лянгузова Ирина Владимировна (ученый секретарь), д.б.н. Андреев М. П., д.б.н. Горшков В. В., д.б.н. Ивченко Т. Г. (удал.), д.б.н. Казнина Н. М. (удал.), д.б.н. Крышень А. М. (удал.), д.б.н. Медведев С. С., д.б.н. Нешатаева В.Ю., д.б.н. Потемкин А. Д. (удал.), д.б.н. Родионов А. В. (удал.), д.б.н. Сафронова И. Н, д.б.н. Холод С. С., д.б.н. Шереметьев С. Н. (удал.), д.б.н. Шнеер В. С.

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 27 апреля 2023 г. № 168

О присуждении Зорину Евгению Андреевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Анализ дифференциальной экспрессии генов при образовании азотфиксирующих клубеньков и арбускулярной микоризы у *Pisum sativum* L.» по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений принята к защите 8 февраля 2023 г. (протокол заседания № 165) 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

Рособрнадзора № 737-465 от 04.04.2008 с внесенными изменениями, утвержденными приказами: приказ Рособрнадзора № 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 Зорин Евгений Андреевич, 29 июня 1993 года рождения. В 2015 г. окончил бакалавриат по направлению «Педагогическое образование», в 2018 г. окончил магистратуру по направлению «Биология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет». В 2022 г. окончил очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки, специальность 03.02.03 -«Микробиология».

Работает младшим 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 генетики растительно-микробных взаимодействий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель — кандидат биологических наук Жуков Владимир Александрович, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», заведующий лабораторией генетики растительно-микробных взаимодействий

Официальные оппоненты:

Гоголев Юрий Викторович — доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии;

Дорошков Алексей Владимирович — кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», научный сотрудник сектора изучения моногенных форм распространенных заболеваний

человеках

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Институт биохимии и генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа, в своем положительном отзыве, подписанном Баймиевым Андреем Ханифовичем, доктором биологических наук, ведущим научным сотрудником лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов, указал, что работа представляет собой законченное, самостоятельное исследование, которое содержит решение актуальной задачи, имеющей важное значение для биологической науки. 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, Зорин Евгений Андреевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений.

Соискатель имеет 29 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 11 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 5 работ.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Zorin E.A.**, Kliukova M.S., Afonin A.M., Gribchenko E.S., Gordon M.L., Sulima A.S., Zhernakov A.I., Kulaeva O.A., Romanyuk D.A., Kusakin P.G., Tsyganova A.V., Tsyganov V.E., Tikhonovich I.A., Zhukov V.A. A variable gene family encoding nodule-specific cysteine-rich peptides in pea (*Pisum sativum* L.) // **Frontiers in Plant Science**. 2022. 13:884726. doi: 10.3389/fpls.2022.884726.
2. **Зорин Е. А.**, Жуков В. А. Симбиотические гены бобовых растений, выявляемые путём транскриптомного анализа // **Биомика**. 2022. Т. 14. №3. С. 285-294. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-26
3. **Zorin E.A.**, Afonin A.M., Kulaeva O.A., Gribchenko E.S., Shtark O.Y., Zhukov V.A. Transcriptome analysis of alternative splicing events induced by arbuscular mycorrhizal fungi (*Rhizophagus irregularis*) in pea (*Pisum sativum* L.) roots // **Plants**. 2020. V. 9. P. 1700. <https://doi.org/10.3390/plants9121700>.
4. **Зорин Е.А.**, Кулаева О.А., Афонин А.М., Жуков В.А., Тихонович И.А. Анализ событий альтернативного сплайсинга в кончиках корней и клубеньках *Pisum sativum* L // **Экологическая генетика**. 2019. Т. 17. №1. С. 53-63. doi: 10.17816/ecogen17153-63.
5. **Зорин Е.А.**, Ключкова М.С., Кулаева О.А., Афонин А.М., Тихонович И.А., Жуков

В.А. Идентификация последовательностей, кодирующих NCR-пептиды и дефензины, в метасборке транскриптома азотфиксирующих клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // **Экологическая генетика**. 2019. Т. 17. №3. С. 39-46. doi: 10.17816/ecogen17339-46.

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

На диссертацию и автореферат поступило 7 отзывов от:

1. **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»
2. **Галкиной Марии Андреевны** — кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории молекулярной систематики растений Главного ботанического сада им. Н. В. Цицина Российской академии наук
3. **Лебедевой Марии Александровны** — кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника кафедры генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета
4. **Журавлёвой Галины Анатольевны** — доктора биологических наук, профессора кафедры генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета
5. **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)
6. **Румянцевой Марины Львовны** — кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории генетики и селекции микроорганизмов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»
7. **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 продуманным, последовательным, оригинальным и законченным исследованием, выполненном на высоком методическом уровне, результаты и методы изложены ясно, а выводы сделаны на основе анализа изложенных результатов. Работа имеет большую теоретическую и практическую значимость и полученные данные являются основой для дальнейших исследований.

**Платонову Андрею Викторовичу** хочется услышать мнение автора по поводу перспектив применения полученных научных данных при разработке биопрепаратов для сельского хозяйства, которые могли бы способствовать повышению продуктивности бобовых, а также их устойчивости к стрессовым воздействиям.

**Андронов Евгений Евгеньевич** отмечает, что особый интерес представляет параллельное исследование транскриптомов микоризованных корней и азотфиксирующих клубеньков гороха, демонстрирующие явные сходства и различия между этими эволюционно родственными процессами, важное для понимания всё ещё не вполне ясной последовательности освоения бобовыми растениями исключительно продуктивной ниши симбиоза с микроорганизмами

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что Гоголев Юрий Викторович является крупным специалистом, имеющим публикации в области физиологии растений, изучения бобово-ризобияльного симбиоза, биохимии и транскриптомики. Дорошков Алексей Владимирович — известный специалист, имеющий публикации в области физиологии растений, изучения транскриптомной изменчивости различных тканей растений. Институт биохимии и генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук известен своими достижениями в области изучения транскриптомики растительных тканей, в том числе и при взаимодействии с микроорганизмами, что позволяет ведущей организации определить научную и практическую значимость диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований с использованием подхода высокопроизводительного секвенирования, впервые было описано разнообразие генов гороха посевного (*P. sativum* L.), кодирующих нодулины, микоризины и симбиозины. С использованием симбиотических мутантов показано, что многие из генов, кодирующих симбиозины, могут находиться под контролем транскрипционных факторов EFD и IPD3. Охарактеризованы события альтернативного сплайсинга в азотфиксирующих клубеньках и микоризованных корнях гороха,

повышающие разнообразие транскриптома в указанных органах и тканях гороха. Исследовано и охарактеризовано уникальное по степени разнообразия семейство генов, кодирующих клубеньк-специфичные пептиды NCR у *P. sativum*, изучены особенности экспрессии генов, кодирующих пептиды NCR, и её регуляции. Получено подтверждение эволюционного происхождения семейства генов, кодирующих пептиды NCR, путём дупликаций и дивергенции; предложен список генов, кодирующих нодулины, микоризины и симбиозины, а также генов, паттерн альтернативного сплайсинга мРНК которых является специфичным для азотфиксирующих клубеньков и микоризованных корней *P. sativum*; доказано наличие антимикробной активности в отношении *R. leguminosarum* у двух представителей семейства генов, кодирующих пептиды NCR. Обнаружено, что экспрессия генов, кодирующих пептиды NCR, связана с фенотипом клубеньков и степенью дифференцировки бактериоидов, что говорит о важности пептидов NCR для различных стадий этого процесса у *P. sativum*.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: доказаны положения, вносящие вклад в существующие представления о генетических детерминантах формирования и функционирования азотфиксирующего и арбускулярно-микоризного симбиозов у *P. sativum*; применительно к проблематике диссертации результативно использованы современные методы секвенирования, транскриптомики, биоинформатики, молекулярной биологии и микробиологии, оптимально подобранные для решения поставленных задач; изложены положения о влиянии азотфиксирующих бактерий и грибов арбускулярной микоризы на транскриптомную изменчивость *P. sativum*; раскрыты генетические и транскрипционные механизмы, ответственные за формирование и функционирование азотфиксирующего и арбускулярно-микоризного симбиозов у *P. sativum*; изучена взаимосвязь между экспрессией генов, кодирующих пептиды NCR, и степенью дифференцировки бактериоидов у дикого типа и мутантных линий *P. sativum*; проведена модернизация методов геномного поиска и характеристики представителей семейств генов, кодирующих короткие пептиды у растений.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что: определены потенциальные генетические детерминанты, принимающие участие в ответе растения-хозяина на взаимодействие с полезными почвенными микроорганизмами; созданы списки генов, которые могут служить маркерами симбиотической эффективности и могут быть использованы в дальнейшем в селекционной работе; выявлены антимикробные пептиды NCR, которые в дальнейшем могут рассматриваться, как антибиотики и иметь применение в медицине.

Оценка достоверности результатов исследования выявила: для экспериментальных

работ использовалось сертифицированное оборудование, подтверждающее воспроизводимость результатов исследования в различных условиях; теория основана на проверяемых данных и согласуется с опубликованными данными по теме диссертации. Положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации хорошо аргументированы, полностью отвечают поставленной цели и задачам; идея базируется на обобщении имеющихся литературных сведений и результатов собственных исследований; использовано сравнение авторских данных о транскриптомной изменчивости в симбиотических органах и тканях и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике; установлено качественное совпадение авторских результатов изучения транскриптомных изменений в азотфиксирующих клубеньках и микоризованных корнях *P. sativum* и данных, полученных на близкородственных организмах, представленных в мировой литературе.

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

В ходе защиты диссертации не было высказано критических замечаний.

Соискатель Зорин Е. А. ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию.

Вопрос д.б.н. Медведева С.С. Пептиды NCR участвуют только в клубенькообразовании или же имеют какие-то другие функции?

Ответ: пептиды NCR участвуют в дифференцировке бактериоидов, однако часть пептидов имеет антимикробную функцию, посредством которой может, например, подавлять иммунный ответ у растения-хозяина.

Вопрос д.б.н. Медведева С.С. Где экспрессируются гены пептидов NCR? Только в клубеньках?

Ответ: гены этого семейства работают только в азотфиксирующих клубеньках. Причём только в клубеньках бобовых, имеющих недетерминированный тип клубеньков

Вопрос д.б.н. Медведева С.С. Вы выявили факторы транскрипции, которые регулируют экспрессию генов, кодирующих нодулины. Есть ли ещё какие-то транскрипционные факторы, регулирующие экспрессию этих генов?

Ответ: мы провели работу по анализу коэкспрессионных сетей различных транскрипционных факторов и исследуемых генов. В результате статистического анализа

было выявлено, что их экспрессию регулирует также транскрипционный фактор IPD3 и EFD.

Вопрос д.б.н. Медведева С.С. По отношению к чему Вы оцениваете специфичность экспрессии генов нодулинов и микоризингов? В чём выражается эта специфичность?

Ответ: экспрессия этих генов обеспечивает транскриптомную специфичность клубеньков и микоризованных корней, поскольку эти гены работают исключительно в этих тканях. То есть всего в клубеньках дифференциально экспрессируются 4000 генов, при этом почти 50% являются специфичными для клубеньков, что и делает клубеньки органом с высокой степенью транскриптомной специфичности.

Вопрос д.б.н. Родионова А. В. Вы показали, что у генов NCR большое количество несинонимичных замен. Как Вы это объясняете?

Ответ: большой процент несинонимичных замен вписывается в концепцию эволюции этих генов. Они фланкированы транспозонами и постоянно перемещаются по геному. По сути, гены пептидов NCR – это аналог антител млекопитающих. Поэтому им нужно иметь высокую степень полиморфизма и, соответственно, количество несинонимичных замен.

Вопрос д.б.н. Родионова А. В. Вы говорите о 66 генов симбиозингов, и что существует консервативный пул у разных бобовых, а есть видоспецифичный. Как Вы определяете видоспецифичный ген? Это какой-то новый ген или ген с особой комбинацией доменов?

Ответ: к видоспецифичному пулу относится набор генов, которые являются именно симбиозинами у данного вида. То есть ген может присутствовать в геноме других бобовых, и даже экспрессироваться в каких-то тканях, однако он не попадает в группу симбиозингов.

Вопрос Бобровских А. На основании каких данных была построена генная сеть?

Ответ: сеть построена в Cytoscape. Она строится на основе данных экспрессии интересующих нас генов-мишеней и набора транскрипционных факторов. В результате корреляционного анализа устанавливается связь между паттернами экспрессии генов-мишеней и транскрипционных факторов.

Вопрос Бобровских А. То есть сеть строится на основе 3-4 транскрипционных факторов?

Ответ: нет, в анализ берутся все экспрессирующиеся в ткани транскрипционные факторы, а потом, на основании статистической значимости, отбираются наиболее валидные.

Вопрос д.б.н. Цыганова В. Е. Гены симбиозингов включают ли в себя сим-гены, выявленные с помощью мутагенеза?



