

В Диссертационный совет 24.1.002.02.  
на базе ФГБУН Ботанического  
института им. В.Л. Комарова  
Российской академии наук

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Гоголева Юрия Викторовича на диссертационную работу Зорина Евгения Андреевича «Анализ дифференциальной экспрессии генов при образовании азотфиксирующих клубеньков и арбускулярной микоризы у *Pisum sativum* L.», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений.

#### **Актуальность темы исследования**

Взаимодействие бобовых растений и полезных почвенных микроорганизмов в настоящее время является одной из наиболее активно изучаемых областей в физиологии растений. С одной стороны, это обусловлено очевидной значимостью исследований для фундаментальной науки как с точки зрения важности их роли в росте и развитии растений, так и с точки зрения эволюционных особенностей симбионтов, а с другой – имеют место постоянно возрастающие запросы сельского хозяйства в прикладных исследованиях и разработках, направленных на повышение урожайности и качества возделываемых культур, а также снижения потерь от действия неблагоприятных абиотических и биотических факторов. Несмотря на большое число исследований транскриптомных изменений при формировании мутуалистических симбиозов модельных бобовых растений (лотос, соя, люцерна), целый ряд вопросов остаются неизученными. Это определяет актуальность темы диссертационного исследования Зорина Евгения Андреевича, посвященного изучению эффектов образования мутуалистических симбиозов азотфиксирующих бактерий и грибов арбускулярной микоризы с горохом

посевным на транскриптом растения-хозяина.

### **Научная новизна исследования**

В работе Зорина Е.А. получены интересные результаты, которые определяют научную новизну диссертации. В частности, впервые выявлены гены гороха посевного, кодирующие симбиозины, в том числе гены, экспрессия которых находится под контролем транскрипционных факторов EFD и IPD3. Впервые выявлен ряд генов с профилем альтернативного сплайсинга, специфичным для растений, образующих арбскулярную микоризу. Впервые описан полный набор генов, кодирующих пептиды NCR в геноме гороха посевного, продемонстрирована кластерная организация этих генов и их согласованная экспрессия, что указывает на их особую роль в процессах дифференцировки бактериоидов, а также формирования, функционирования и старения клубенька. Показано участие альтернативного сплайсинга в регуляции экспрессии симбиоз-ассоциированных генов. Выявлены группы генов, общие и специфичные для клубеньков и микоризованных корней гороха.

### **Теоретическая и научно-практическая значимость исследования**

В области фундаментальной науки работа расширяет представления об особенностях экспрессии симбиоз-ассоциированных генов в симбиотических системах гороха посевного. Таким образом, результаты диссертационной работы Зорина Е.А. представляют значимый научный интерес, так как способствуют пониманию регуляции развития и функционирования бобово-ризобиального симбиоза. Результаты работы также имеют несомненные перспективы практического использования. В частности, представленный материал непосредственно может быть использован для выбора маркеров эффективности симбиозов, образуемых *Pisum sativum* и послужить материалом для маркер-ориентированной селекции данной культуры. Кроме того, описанные в работе антимикробные пептиды NCR могут претендовать на роль перспективных антибиотиков, что чрезвычайно востребовано в медицине и других областях.

### **Обоснованность и достоверность результатов исследования**

Диссертационное исследование выполнено на достаточном высоком научно-методическом уровне. Используются современные подходы

высокопроизводительного секвенирования и одномолекулярного секвенирования на платформе Oxford Nanopore, обеспечивающие высокое качество данных. Применяемые биоинформатические алгоритмы не вызывают сомнений с точки зрения надежности и достоверности анализа данных. Все научные положения, выносимые на защиту и сделанные выводы обоснованы и логично вытекают из результатов диссертационной работы. Методологические подходы, использованные Зориным Е.А., соответствуют решению поставленных задач и детально описаны, что обеспечивает воспроизводимость результатов.

### **Структура и содержание диссертационной работы**

Работа построена по классическому для кандидатских диссертаций плану, содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Текст диссертации изложен на 126 страницах, содержит 9 таблиц и 22 рисунка. Список литературы включает в себя 162 источника.

Во «Введении» обоснована актуальность выбранной темы, научная новизна исследования, сформулированы цель и задачи работы, представлены научно-теоретическая и практическая значимость и положения, выносимые на защиту.

В главе «обзор литературы» диссертант описывает механизмы генетического и транскрипционного контроля клубенькообразования и микоризации. В частности, особое внимание уделено роли генов, кодирующих нодулины, микоризины и симбиозины. Подробно описан механизм альтернативного сплайсинга, влияющий на транскриптомные изменения в органах и тканях растения-хозяина в процессе клубенькообразования и микоризации. Детально обсуждается роль генов, кодирующих пептиды NCR в процессах клубенькообразования и азотфиксации у бобовых растений.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание всех экспериментальных методов данной работы, а также пояснения к выбору объектов исследования. Следует подчеркнуть, что исследование выполнено с использованием современных молекулярно-генетических и биоинформатических подходов.

В главе «Результаты и обсуждение» представлены результаты собственных исследований диссертанта, посвященных обоснованию выбора объекта исследований, идентификации генов нодулинов, микоризинов и симбиозинов, проведенного, анализа

альтернативного сплайсинга в клубеньках и микоризованных корнях гороха посевного, выявлению, описанию и анализу экспрессии генов, кодирующих пептиды NCR. В работе были получены интересные данные о группах с функциональной общностью и специфичностью дифференциально экспрессирующихся генов при различных видах симбиоза. Особого интереса заслуживает раздел, посвященный анализу участия альтернативного сплайсинга в регуляции экспрессии симбиоз-ассоциированных генов. Данный раздел исследований проведен на высоком методическом уровне, обеспечиваемом комплексным подходом, основанном на использовании различных методов для подтверждения достоверности результатов. Глава снабжена информативными рисунками, облегчающими восприятие материала.

В главе «Обсуждение» дана подробная интерпретация полученных результатов в контексте с литературными данными.

В главе «Заключение» Евгений Андреевич в краткой форме подводит итог проведенных исследований и резюмирует ключевые положения диссертационной работы.

Выводы, сделанные автором, полностью соответствуют поставленной цели, задачам и содержанию работы.

Ознакомление с авторефератом позволяет заключить, что он полностью отражает основные результаты выполненной диссертационной работы.

### **Сведения о полноте опубликованных научных результатов**

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 11 печатных работах, из которых 5 в журналах, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в международных базах данных; два издания относятся к первому квартилю.

### **Общие вопросы и замечания по работе**

Существенных недостатков в работе не обнаружено, однако имеются отдельные вопросы и замечания:

1. Несмотря на то, что приготовление библиотек и секвенирование проводилось по договору, необходимо представить общие статистические данные сырых и обработанных ридов по повторностям. Также стоит добавить приложение с таблицей дифференциально экспрессирующихся генов, включающую значения относительной

представленности и достоверности отклонений. Оппонент не нашел также в рукописи ссылку на депонирование данных, позволяющую ознакомиться с биопроектом.

2. В разделе, посвященном количественному ОТ-ПЦР отсутствует обоснование выбора референсного гена *gapC1*. Надежность референсного гена зависит от многих параметров его экспрессии, в первую очередь стабильности активности в условиях эксперимента и соотносимости уровня экспрессии с целевыми генами. По этой причине во многих случаях используют набор референсных генов, если нет надежных данных о соответствии выбранного гена обозначенным критериям. Необходимо пояснить, имеются ли такие данные в отношении гена *gapC1*, либо автором были проведены предварительные эксперименты по оценке релевантности выбранного гена.

3. Данные о характере изменения транскрипции генов бактерий на обработку пептидом PsNCR478 описаны весьма фрагментарно. Дано лишь общее описание ответа *rpoC* на обработку в течение 10 и 30 мин, без количественных значений. О других генах, указанных в разделе «Материалы и методы», сведения отсутствуют. Также не представлена информация о параметрах нормализации данных. Информативность данного раздела в представленном виде вызывает сомнения, тем более что эти данные не нашли отражения в главе «Обсуждение». По мнению оппонента эти данные должны быть исключены из настоящей работы, что не скажется на общем качестве материала.

В целом работа написана хорошим научным языком, хорошо оформлена, однако некоторые рисунки и таблицы могут быть улучшены. Особенно это касается рисунка 4.

### **Заключение**

Диссертационная работа Зорина Евгения Андреевича «Анализ дифференциальной экспрессии генов при образовании азотфиксирующих клубеньков и арбускулярной микоризы у *Pisum sativum* L.», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биологические науки), является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований осуществлено решение актуальной задачи, имеющей важное значение для биологической науки в целом.

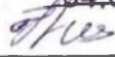
По своей актуальности, научной новизне, объему экспериментальных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9-11, 13-14

установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор – Зорин Евгений Андреевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биологические науки).

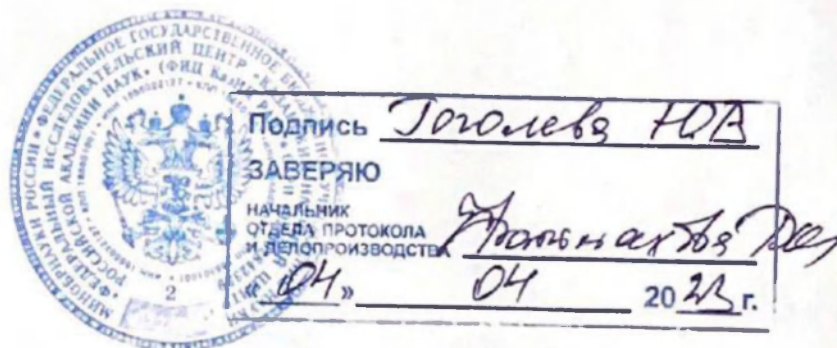
Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией молекулярной биологии Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», доктор биологических наук (специальность 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»).

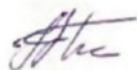
04.04.2023 года

 Гоголев Юрий Викторович

Подпись Гоголева Ю.В. заверяю



Согласен на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных при работе диссертационного совета 24.1.002.02 по диссертационной работе Зорина Евгения Андреевича «Анализ дифференциальной экспрессии генов при образовании азотфиксирующих клубеньков и арбускулярной микоризы у *Pisum sativum* L.», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биологические науки).



Гоголев Юрий Викторович

Адрес места работы: 420088, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. акад. Арбузова, д. 8, литера Р, Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук»

E-mail: [gogolev.yuri@gmail.com](mailto:gogolev.yuri@gmail.com); Тел.: +7 (843) 231-90-36, +7 (917) 916-83-81

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