

## Сведения о результатах публичной защиты

**Иванова Кира Андреевна**

Диссертация «Роль низкомолекулярных тиолов в развитии и функционировании эффективных и неэффективных симбиотических клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum* L.)»

**Председатель** д.б.н. Ярмишко Василий Трофимович

**Присутствовали:** д.б.н. Лянгузова Ирина Владимировна (ученый секретарь);

д.б.н. Горшков В. В., д.б.н. Медведев С. С. (удал.), д.б.н. Нешатаева В. Ю., д.б.н. Новожилов Ю. К., д.б.н. Потемкин А. Д., д.б.н. Родионов А. В. (удал.), д.б.н. Сафронова И. Н., д.б.н. Тарасова В. Н. (удал.), д.б.н. Холод С. С., д.б.н. Цыганов В. Е., д.б.н. Шереметьев С. Н. (удал.), д.б.н. Шнеер В. С., д.б.н. Шишова М. Ф. (удал.).

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 24 ноября 2021 г. №148

О присуждении Ивановой Кире Андреевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Роль низкомолекулярных тиолов в развитии и функционировании эффективных и неэффективных симбиотических клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum* L.)» по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений принята к защите 9 июня 2021 г. (протокол заседания № 139) диссертационным советом 24.1.002.02, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, дом 2, 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.

Соискатель Иванова Кира Андреевна, 22 декабря 1987 года рождения. В 2009 г. окончила бакалавриат по направлению «Биология», в 2011 г. освоила основную образовательную программу высшего профессионального образования Биология с присвоением квалификации магистр биологии в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет». В 2015 году окончила очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» по специальности 03.02.03 – «Микробиология». В 2021 г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Ботаническим институтом им. В.Л. Комарова Российской академии наук выдана справка об обучении по направлению 06. 06. 01 – «Биологические науки», по специальностям 03.02.03 – «Микробиология» и 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений».

Работает младшим научным сотрудником в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии».

Диссертация выполнена в Лаборатории молекулярной и клеточной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии».

Научный руководитель – доктор биологических наук Цыганов Виктор Евгеньевич, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», заведующий лабораторией молекулярной и клеточной биологии.

#### **Официальные оппоненты:**

**Топунов Алексей Федорович** – доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», институт биохимии им. А.Н. Баха, лаборатория биохимии азотфиксации и метаболизма азота, заведующий лабораторией;

**Емельянов Владислав Владимирович** – кандидат биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», кафедра физиологии и биохимии

растений, доцент

дали положительные отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, г. Казань в своем положительном отзыве, подписанном **Минибаевой Фаридой Вильевной**, доктором биологических наук, заведующей лабораторией окислительно-восстановительного метаболизма, указала, что диссертационная работа «Роль низкомолекулярных тиолов в развитии и функционировании эффективных и неэффективных симбиотических клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum* L.)» является завершенным самостоятельным научным исследованием и вносит теоретический и практический вклад в понимание молекулярных механизмов формирования и функционирования симбиотических клубеньков бобовых растений. Полученная в ходе выполнения данной диссертационной работы информация обогащает современное знание проблемы. Полученные результаты могут быть использованы в биологических, сельскохозяйственных, биотехнологических научных институтах, а также в ВУЗах при чтении курсов по физиологии и биохимии растений, биотехнологии. По теоретическому уровню, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям в соответствие с пунктом 8 «Положения о порядке присуждения ученой степени». Автор работы, Иванова Кира Андреевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений.

Соискатель имеет 22 опубликованные работы, в том числе по теме диссертации опубликовано 19 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 4 статьи, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus.

**Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:**

1. Tsyganova A.V., **Ivanova K.A.**, Tsyganov V.E. Histological and ultrastructural nodule organization of the pea (*Pisum sativum*) mutant SGEFix--5 in the *Sym33* gene encoding the transcription factor *PsCYCLOPS/PsIPD3* // Ecological genetics. 2019. V. 17.1. P. 65-70.
2. **Ivanova K.A.**, Tsyganov V.E. Antioxidant defense system in symbiotic nodules of legumes // Agricultural Biology. 2017. V. 52.5 P. 878-894.
3. **Ivanova K.A.**, Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. Induction of host defences by *Rhizobium* during ineffective nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) carrying symbiotically defective mutations *sym40* (*PsEFD*), *sym33* (*PsIPD3/PsCYCLOPS*) and *sym42* // Protoplasma. 2015. V. 252.6. P.1505-1517.

4. **Ivanova K.A.**, Tsyganov V.E. Defense responses during the Legume – *Rhizobium* symbiosis: induction and suppression // *Agricultural Biology*. 2014. V. 3. P. 3-12.

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

На диссертацию и автореферат поступило 9 отзывов от:

1. **Андропова Евгения Евгеньевича** – кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника, заведующего лабораторией микробиологического мониторинга и биоремедиации почв Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» Российской академии наук.
2. **Будкевич Тамара Амвросиевна** – кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника отдела научно-технической информации, маркетинга и патентного дела Государственного научного учреждения «Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича национальной академии наук Беларуси».
3. **Вишняковой Маргариты Афанасьевны** – доктора биологических наук, профессора, главного научного сотрудника, заведующей отдела Генетических ресурсов зернобобовых культур Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова».
4. **Войцеховской Ольги Владимировны** – кандидата биологических наук, заведующей лабораторией молекулярной и экологической физиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В. Л. Комарова Российской академии наук.
5. **Галушко Александра Сергеевича** – кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника, заведующего сектором экологической микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Агрофизический научно-исследовательский институт» и **Пановой Гаянэ Геннадьевны**, кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника, заведующей отделом светофизиологии растений и биопродуктивности агроэкосистем Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Агрофизический научно-исследовательский институт».
6. **Ильиной Елены Леонидовны** – кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории клеточных и молекулярных механизмов развития растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Ботанического института им. В. Л. Комарова Российской академии наук.

7. **Лебедевой Марии Александровны** – кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника кафедры генетики и биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».
8. **Розова Сергея Михайловича** – кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».
9. **Ткаченко Оксаны Викторовны** – кандидата сельскохозяйственных наук, доцента кафедры «Растениеводство, селекция и генетика» Агрономического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова».

Все отзывы положительные. В отзывах отмечено, что диссертационная работа является полным, системным и актуальным исследованием, отличается информативной емкостью, четкостью и логичностью изложения. Цели и задачи исследования выполнены полностью. Работа имеет большую теоретическую и практическую значимость.

В ряде отзывов имеются замечания, вопросы и комментарии.

**Войцеховская Ольга Владимировна** в качестве замечаний отмечает, что можно было уделить больше внимания деталям статистической обработки полученных данных.

**Галушко Александр Сергеевич** и **Панова Гаянэ Геннадьевна** отмечают, что содержание раздела 1.2 было бы желательно иллюстрировать рисунком, показывающим относительные уровни транскриптов изученных генов-маркеров защитных реакций растений, а в Таблице 1: 1) нельзя использовать «нМ/мг сырого веса», это соответствует нмоль/(литр × мг сырого веса), надо использовать «нмоль/мг сырого веса»; 2) написано «Значения были нормализованы относительно количества GSH (нМ/мг сырого веса) в клубеньках дикого типа через 1 или 3 недели после инокуляции», вследствие этого единицу концентрации (нМ/мг сырого веса) следует удалить. Считают, что для оценки соотношения глутатиона/гомолглатиона желательно учитывать присутствие ко-субстратов (глицина и аланина, соответственно), наличие/образование которых может сильно влиять на образование этих тиолов.

**Лебедева Мария Александровна** спрашивает, чем руководствовался автор при выборе концентраций BSO и GSH для обработки растений в ходе эксперимента по анализу экспрессии генов и в эксперименте по изучению морфологии клубеньков?

**Ильина Елена Леонидовна** спрашивает, чем обусловлен выбор именно глутатиона среди всех известных для растений антиоксидантов?

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что **Топунов Алексей Федорович** является крупным специалистом в области физиологии и биохимии растений и имеет многочисленные публикации по физиологии и биохимии бобово-ризобиального симбиоза; **Емельянов Владислав Владимирович** является известным специалистом в области физиологии и биохимии растений, имеющим публикации по физиологии окислительного стресса у растений. **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук** широко известно своими достижениями в области физиологии и биохимии растений, изучении окислительного стресса у растений, исследованиях симбиотических и патогенных отношений между растениями и микроорганизмами, что позволяет ведущей организации определить научную и практическую значимость диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований: разработана новая научная идея о регуляции взаимодействия между симбиотическими бактериями и бобовыми растениями посредством низкомолекулярных тиолов глутатиона и гомоглутатиона, вовлеченных как в процесс формирования симбиотического клубенька, так и в регуляцию растительных защитных реакций, сопровождающих его развитие, расширяя знания о взаимосвязи мутуалистических и антагонистических отношений при формировании бобово-ризобиального симбиоза; предложена оценка влияния низкомолекулярных тиолов на симбиотические клубеньки гороха посевного не только на основе анализа их количества, но и их соотношения; доказаны связь количества и соотношения тиолов со степенью развития инфекции в симбиотических клубеньках гороха, а также их участие в развитии меристемы клубенька и функционировании азотфиксирующих клеток и бактериоидов, а также выявлены связи симбиотических мутаций гороха с развитием защитных реакций в неэффективных клубеньках и вовлеченность глутатиона и гомоглутатиона в регулирование этих реакций; показано, что недостаток тиолов вызывает снижение числа клубеньков, индукцию раннего старения в клубеньках гороха дикого типа.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: доказаны положения, вносящие вклад в существующие представления о фундаментальных закономерностях биологической азотфиксации и устойчивости растений к патогенам, имеющие важное прикладное значение для повышения их эффективности; применительно к проблематике диссертации результативно использовано большое количество современных методов

микроскопии, молекулярно-биологического и биохимического анализа растений, а также методов статистической обработки результатов; изложены положения, восполняющие ряд пробелов в понимании молекулярных механизмов формирования и функционирования симбиотических клубеньков бобовых растений; раскрыты механизмы регуляции органогенеза клубенька и его инфекции посредством изменения количества и соотношения тилолов; изучены закономерности формирования и функционирования эффективных и неэффективных симбиотических клубеньков гороха и их связь с проявлением растениями защитных реакций. Проведена модернизация методики окрашивания растительной ткани на выявление отложений суберина, а также методики подсчета относительной экспрессии генов по результатам полимеразной цепной реакции «в реальном времени».

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что: определены перспективы практического использования результатов диссертационного исследования в сельском хозяйстве; полученная в ходе выполнения данной диссертационной работы информация обогащает современное знание о молекулярных механизмах формирования и функционирования симбиотических клубеньков бобовых растений. Данная информация может быть использована при конструировании высокоэффективных растительно-микробных систем.

Полученные результаты могут быть использованы в биологических, сельскохозяйственных, биотехнологических научных институтах, а также в ВУЗах при чтении курсов по физиологии и биохимии растений, биотехнологии.

Оценка достоверности результатов исследования выявила комплексность подходов и современный методический уровень исследований. Достоверность результатов обеспечена проведением исследований на высокотехнологичном оборудовании с использованием классических и современных гистологических, цитологических, биохимических и молекулярно-биологических подходов и методов и предполагает возможность воспроизведения экспериментов при постановке в аналогичных условиях.

Теоретические положения работы основаны на проверяемых фактах и согласуются с опубликованными данными по теме диссертации. Основные положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации полностью отвечают поставленной цели и задачам, хорошо аргументированы, построены на проверяемых фактах и согласуются с опубликованными данными по теме диссертации и смежным отраслям.

Идея базируется на обобщении передового опыта в области изучения бобово-ризобиального симбиоза и на использовании адекватных генетических моделей – симбиотических мутантов гороха, блокированных на разных стадиях развития

симбиотического клубенька, выявлении новых фенотипических признаков, ассоциированных с мутациями в симбиотических генах гороха, и применении передовых методов конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией, и анализа экспрессии генов в режиме реального времени.

Проанализировано большое число литературных источников, российских и зарубежных. Проведено сравнение авторских данных и данных, опубликованных в работах других авторов.

Установлено качественное совпадение авторских результатов с данными, полученными ранее для других бобовых растений. Используются современные методы сбора и обработки данных.

Личный вклад соискателя состоит в планировании исследований, в постановке цели и задач, анализе и обобщении имеющихся литературных данных, выборе методов исследования, непосредственном участии в сборе и обработке данных в ходе экспериментов, в статистической обработке, анализе, обобщении и интерпретации полученных данных, формулировке и интерпретации выводов, а также в написании статей, опубликованных по теме диссертационной работы и представлении результатов на научных конференциях.

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания: желательно рассматривать не просто низкомолекулярные тиолы, а установить и исследовать соотношение их окисленной и восстановленной формы.

Соискатель Иванова К.А. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию

Вопрос д.б.н. Нешатаевой В.Ю. В чем отличие бактерий и бактериоидов?

Ответ. Бактероиды – это специализированная форма бактериального симбиотического партнера, образующаяся в результате его дифференцировки после высвобождения в растительную цитоплазму, по сути являющаяся временной органеллой клетки растения.

Вопрос д.б.н. Ярмишко В.Т. Почему Вы выбрали этот объект, горох посевной?

Ответ. Горох не является модельным объектом, но при этом имеет огромное сельскохозяйственное значение, поэтому изучать этот объект очень важно.

Вопрос к.б.н. Демченко К.Н. Какую часть корня Вы использовали в варианте «неинокулированные корни»?

Ответ. Мы использовали всю корневую систему.

Вопрос д.б.н. Шнеер В.С. Мутанты – это инструмент изучения? Гены, по которым получены используемые в работе симбиотические мутанты, относятся к



мультигеновым геном гороха? Кодируют ли они один или несколько белков?

Ответ. Мутанты являются своеобразными инструментами изучения. Гены *sym33-3*, *sym33-2*, *sym40-1* не относятся к мультигеновым и кодируют только по одному белку.

Вопрос д.б.н. Шишовой М.Ф. Почему Вы изучали только тиолы, но не аскорбат, также являющийся важным антиоксидантом у растений? Могут ли микросимбионты влиять на синтез глутатиона у растения-хозяина?

Ответ. Наша цель была различить функции глутатиона и его гомолога гомоглутатиона, специфичного только для бобовых, в эффективных и неэффективных симбиотических клубеньках, так как этот вопрос до сих пор остаётся малоизученным, поэтому мы сконцентрировались именно на тиолах. Кроме того, для глутатиона показано влияние как на эффективность биологической азотфиксации, так и на защитный ответ растения. Бактериоды сами могут синтезировать глутатион, который ничем не отличается от растительного.

Вопрос д.б.н. Медведева С.С. Анализировали ли Вы ферментативную активность ферментов биосинтеза тиолов? Почему Вы использовали относительные значения содержания тиолов? Почему Вы анализировали отложения суберина? Связаны ли отложения суберина напрямую с метаболизмом тиолов?

Ответ. Мы не анализировали ферментативную активность ферментов биосинтеза тиолов, однако, мы анализировали экспрессию генов, кодирующих ферменты биосинтеза и содержание глутатиона и гомоглутатиона. В связи с тем, что измерения производились на двух разных приборах, мы провели нормализацию данных каждого эксперимента, чтобы исключить погрешность измерения разных приборов. Напрямую глутатион и суберин не связаны, однако есть данные, что глутатион может влиять на свойства клеточных стенок растений, это явление мы продемонстрировали на примере изменения свойств стенки инфекционных нитей у мутантов *sym33-3* и *sym33-2*.

Вопрос д.б.н. Горшкова В.В. Являются ли описываемые отношения симбиозом или системным взаимодействием? Эффективнее ли фиксирует азот система или бактерии в свободном виде?

Ответ. В случае образования эффективного азотфиксирующего клубенька мы называем эти отношения симбиозом. В данной системе ризобии фиксируют атмосферный азот только в случае взаимодействия с растением.

На заседании 24 ноября 2021 г. диссертационный совет принял решение: за высококвалифицированное выполнение научного исследования и успешное решение научной задачи, имеющей значение для развития физиологии и биохимии растений, экологической и молекулярной физиологии растений присудить Ивановой К.А. ученую

степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования с использованием информационно-коммуникационных технологий диссертационный совет в количестве 15 человек (10 очно, 5 удаленно), из них \_6\_ докторов наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений, участвовавших в заседании, из \_\_21\_\_ человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту \_0\_ человек, проголосовали: за 15, против 0.

Председатель  
диссертационного совета

Ученый секретарь  
диссертационного совета

25.11.2021



Ярмишко Василий Трофимович

Лянгузова Ирина Владимировна