



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук
(УФИЦ РАН)

450054, г. Уфа, проспект Октября, 71. Тел./факс: (347) 235-60-22, 284-56-52, e-mail: presidium@ufaras.ru, presid@anrb.ru
Код организации 81, ОГРН 1030204207582, ИНН 0274064870, КПП 027601001

29.03.2023

№ 17101-931.1-1101

На № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. руководителя Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, д.б.н.



В.Б. Мартыненко

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Кусакина Петра Глебовича «Анализ регуляции дифференцировки растительных клеток при развитии симбиотического клубенька гороха (*Pisum sativum* L.)», представленную в диссертационный совет 24.1.002.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений.

Актуальность избранной темы.

Дефицит азота в почве – распространенное явление, приводящее к падению урожайности растений. При этом растения буквально купаются в азоте воздуха, который они не могут использовать. Способностью переводить газообразный азот в доступную для растений форму обладают некоторые бактерии, а эффективность этого процесса возрастает в клубеньках бобовых растений при их симбиозе с азотфиксирующими бактериями. Это свойство бобовых растений лежит в основе их использования в севообороте для обогащения почв азотом. Все сказанное

определяет актуальность изучения процесса развития симбиотических клубеньков. Многолетние исследования процесса азотфиксации, которые проводились в Институте сельскохозяйственной микробиологии, хорошо известны мировой научной общественности. Однако, несмотря на пристальное внимание исследователей к этому процессу, многие его аспекты остаются не до конца изученными.

Диссертация Петра Глебовича посвящена изучению развития симбиотического клубенька гороха (*Pisum sativum* L.) и его регуляции за счет дифференциальной экспрессии генов, изменения уровня и локализации цитокининов и реорганизации цитоскелета. Выбор гороха в качестве объекта исследований обоснован тем, что эта культура имеет мировое значение. Тем не менее, имеется немало пробелов в изучении развития симбиотических клубеньков гороха, на восполнение которых направлена данная диссертация. Несмотря на то, что ранние этапы развития бобово-ризобияльного симбиоза активно изучаются, молекулярные и клеточные изменения, сопровождающие дифференцировку растительных клеток при развитии зрелого клубенька, всё ещё изучены недостаточно. В данной работе были исследованы различные аспекты регуляции дифференцировки клеток симбиотического клубенька гороха посевного на уровне дифференциальной экспрессии генов, изменения уровня фитогормонов (на примере цитокининов), а также реорганизации цитоскелета.

Хотя транскриптомика *Medicago truncatula* детально изучена, и её результаты обобщены в атласе экспрессии генов растений этого вида, до начала исследований по теме диссертации была только одна публикация с анализом транскрипции генов в клубеньках гороха без определения тканеспецифичной экспрессии. Роль цитокининов в регуляции формирования клубеньков также известна и детально изучается. Однако представления на этот счет базируются, в основном, на сведениях о влиянии экзогенных цитокининов на этот процесс, динамике количественного содержания этих гормонов, а также экспрессии генов, контролируемых метаболизмом и сигналингом цитокининов в процессе формирования клубеньков. Считается, что реорганизация цитоскелета играет важную роль в

развитие клубеньков. Тем не менее, сведений на этот счет недостаточно, что связано со сложностью визуальной оценки перестроек цитоскелета. Из сказанного очевиден дефицит знаний в тех областях, на изучение которых была направлена данная диссертационная работа, что подтверждает её актуальность.

Структура диссертационной работы.

Диссертация Кусакина П.Г. состоит из традиционных разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего ссылки на 266 иностранных и отечественных источников. Работа изложена на 135 страницах, проиллюстрирована 36 рисунками и двумя таблицами. Заключение и выводы демонстрируют тот факт, что цель работы достигнута, что подтверждает завершенность работы.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Диссертантом впервые проведён транскриптомный анализ выделенных с помощью микродиссекции с лазерным захватом тканей и групп клеток из фиксированных образцов клубенька гороха поздней и ранней зон инфекции, а также зоны азотфиксации. Сравнение этих зон позволило выявить большое число изменяющих свою экспрессию генов, что свидетельствует о значительных изменениях при переходе от одной стадии дифференцировки растительных клеток клубенька недетерминированного типа к другой. При сравнении поздней и ранней зон инфекции выявлено понижение экспрессии генов, вовлечённых в работу меристемы, при сравнении зоны азотфиксации с поздней зоной инфекции – повышение уровня экспрессии генов, контролирующей системы транспорта азота.

С помощью метода иммуногистохимической локализации с использованием специфических антител к цитокининам впервые проведено сравнительное изучение уровня и распределения этих гормонов в зоне меристемы, инфекции и азотфиксации клубеньков гороха. Сопоставление результатов иммунолокализации цитокининов у мутантов гороха с нарушениями различных

стадий инфицирования и дифференциации клубеньков позволило сделать заключение о роли данных гормонов в регуляции этих процессов.

Разработан новый подход для количественного анализа ориентации элементов цитоскелета, использующий расширения для программы ImageJ и основанный на выделении изображений отдельных клеток, проведении необходимой подготовки изображений, а также расчёте для каждой клетки параметров, описывающих характер распределения сети элементов цитоскелета и их ориентацию относительно продольной оси клетки.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.

Сравнение результатов иммунолокализации цитокининов в инфекционных клубеньках гороха у растения исходного генотипа и мутантов с отклонениями в процессах инфицирования и формирования клубеньков способствуют углублению представлений о роли этих гормонов в дифференцировке тканей клубенька и формировании симбиосом (Рисунок 25). Так, этот подход выявил возможную связь цитокининов с проникновением бактерий в клетки растений и их дифференцировкой. На это указывает тот факт, что у мутанта *SGEFix⁻-2* (*Pssym33-3*), для которого характерна задержка проникновения бактерий в клетки хозяина, высокий уровень цитокининов выявлен в зоне меристемы, а в зоне инфицирования уровень гормона резко снижается в отличие от растений исходного генотипа, для которого характерно активное накопление цитокининов на поздних стадиях развития клубенька. Видимо, это связано именно с процессом проникновения бактерий внутрь растительной клетки, а также последующей их дифференцировкой. Также обнаружена особенность в распределении цитокининов у мутанта *Sprint-2Fix⁻* (*Pssym31*), которая заключалась в пониженном уровне транс-зеатина, связанного с симбиосомами, по сравнению с растениями исходного генотипа. Поскольку для этого мутанта характерно отсутствие дифференцировки бактериоидов, эти результаты позволяют предполагать, что цитокинины позитивно регулируют дифференцировку бактерий.

Разработанный метод количественного анализа ориентации элементов цитоскелета выявил интересную закономерность, которая заключается в изменении ориентации микротрубочек в азотфиксирующих клетках гороха с упорядоченной на неупорядоченную. Эти результаты свидетельствуют о результативности данного подхода и перспективности его применения для изучения цитоскелета.

В целом данная работа углубляет понимание молекулярных механизмов дифференцировки растительных клеток, что послужит фундаментальной основой для селекции высокоэффективных сортов бобовых, способных наиболее эффективно использовать атмосферный азот.

Обоснованность положений, выводов и заключения диссертации.

Положения, выводы и заключение диссертации П.Г. Кусакина были сделаны на основе применения разнообразных методов: транскриптомики, конфокальной микроскопии и иммуногистохимии, результаты которых обрабатывались статистически с применением современного программного обеспечения. Сделанные диссертантом выводы подтверждаются воспроизводимостью результатов при повторении экспериментов.

Замечания:

1. Поскольку для иммунолокализации цитокининов диссертант использовал антитела, полученные при иммунизации животных рибозидами цитокининов (изопентениладенина и транс-зеатина), описывая ее результаты, диссертант говорит об уровне рибозидов цитокининов. Между тем, способ фиксации тканей растений, который применялся в данной работе (с использованием формальдегида и глутарового альдегида), не позволяет фиксировать рибозиды. При данной фиксации с белками ткани конъюгируют свободные основания (см. работу Dewitte et al., 1999 и Veselov et al., 2018). Поскольку известно, что антитела к рибозиду транс-зеатина обладают высокой кросс-реактивностью не только к рибозидам цитокининов, но и к свободным основаниям, в данной работе выявлялись именно свободные цитокинины. Вместе с тем, именно свободные цитокины

обладают характерной для этих гормонов активностью, и, следовательно, указанные неточности в формулировках не влияют на сделанные диссертантом выводы о роли цитокининов в регуляции дифференцировки клубеньков.

2. Неудачен термин «расщепление цитокининов» под влиянием оксидазы цитокининов, поскольку при этом пуриновое кольцо не расщепляется, а происходит превращение цитокининов в аденин за счет окисления изопреноидного радикала. В этом контексте применяют термин окислительный катаболизм.
3. Допущена ошибка в подписи к рисунку 29. Под буквой Б) следовало указать «азотфиксирующих» вместо «неинфицированных».

Приведенные замечания не снижают высокой оценки данной работы. Она была тщательно продумана и выполнена на высоком методическом уровне с применением разнообразных методов, в результате чего были выявлены новые важные аспекты дифференциации инфицированных клубеньков гороха.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации, а полученные диссертантом результаты приведены в шести статьях, опубликованных в журналах с высоким рейтингом. Результаты, полученные в данной диссертации, могут быть использованы при проведении исследований, связанных с изучением и применением клубеньковых бактерий, в следующих коллективах: Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов), Казанский институт биохимии и биофизики, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН и многих других.

Таким образом, диссертация П.Г. Кусакина является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи изучения регуляции дифференцировки растительных клеток в ходе развития симбиотического клубенька гороха (*Pisum sativum* L.) за счет дифференциальной экспрессии генов, изменения уровня цитокининов и реорганизации цитоскелета, имеющей важное значение для развития физиологии и биохимии растений. По актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертационная работа

П.Г. Кусакина полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 №335, от 02.08.2019 г. №748), предъявляемых к кандидатским диссертациям, а диссертант заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений.

Отзыв на диссертацию П.Г. Кусакина на тему: «Анализ регуляции дифференцировки растительных клеток при развитии симбиотического клубенька гороха» обсужден на заседании Ученого совета Уфимского Института биологии – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (УИБ УФИЦ РАН) (протокол № 2 от 22 марта 2023 г.).

Отзыв подготовила: Высоцкая Лидия Борисовна, доктор биологических наук (03.01.05 – физиология и биохимия растений), Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, ведущий научный сотрудник; почтовый адрес – 450054, проспект Октября, 69, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия; телефон +7(347)2355362, +7(347)2356247; адрес электронной почты: vysotskaya@anrb.ru

Ведущий научный сотрудник
Лаборатории Физиологии растений
УИБ УФИЦ РАН,

Высоцкая Высоцкая Л.Б.

Личную подпись Высоцкой Л.Б. удостоверяю:

Ведущий специалист отдела кадров УФИЦ РАН



Саттарова С.П.