

## ОТЗЫВ

официального оппонента,

кандидата биологических наук Емельянова Владислава Владимировича на диссертационную работу Серовой Татьяны Александровны «Молекулярно-генетические и физиологические механизмы старения симбиотического клубенька гороха посевного (*Pisum sativum* L.)», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Снижение плодородия почв составляет одну из важнейших проблем для сельского хозяйства. В определённой степени снизить остроту этой проблемы позволяет использование минеральных удобрений. Однако многие из них представляют собой невозобновляемые полезные ископаемые, а те, что можно получать синтетическим путём (азотные удобрения), требуют значительных затрат энергии и сильно загрязняют окружающую среду. В силу этого перед биологами стоит первостепенная задача повысить эффективность взаимодействия растений с симбиотическими микроорганизмами - микоризными грибами и ризосферными бактериями, в том числе азотфиксирующими ризобиями. Диссертация Серовой Т.А. посвящена решению именно этой проблемы. В ней рассматриваются механизмы старения симбиотических азотфиксирующих клубеньков растений гороха. Выявление таковых с целью продления функционального состояния симбиотического клубенька позволит увеличить урожайность и одновременно обогатить пахотные почвы азотом. Таким образом, представленная работа обладает необходимыми новизной и актуальностью, имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение.

Диссертационная работа оформлена по традиционному плану. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследований, обсуждения, заключения, выводов, списка публикаций диссертанта по теме исследований, списка литературы, приложения и благодарностей. Диссертация изложена на 181 странице, проиллюстрирована 51 рисунком (и 4 рисунками в приложении), включает в себя 5 таблиц (и 1 таблицу приложения). Также в работе приведён список сокращений. К нему имеется замечание. Сокращение ГА, использованное диссертантом для обозначения гиббереллинов,

является дословной непереведённой с английского калькой с GA - gibberellic acid и на русский язык её лучше переводить как ГК - гибберелловая кислота. Именно аббревиатура ГК содержится в правилах для авторов журналов издательства «МАИК Наука / Интерпериодика».

Далее следует введение, в котором автор обосновывает актуальность проведения данного исследования, формулирует его цель и задачи, научную новизну и значимость.

В обзоре литературы в достаточно лаконичной форме систематизированы современные представления о развитии клубенька от первых этапов его становления и до деградации. Особое внимание уделяется потенциальным маркерам старения и гормональной регуляции этого процесса. В завершении главы диссертант рассматривает перспективы лазерной микродиссекции в качестве метода для изучения растительно-микробных взаимодействий и делает заключение по обзору литературы, в котором ещё раз обосновывает актуальность и значимость проведения исследования. Обзор литературы, как и вся работа, написан хорошим научным русским языком, практически отсутствуют грамматические и орфографические ошибки. Все аббревиатуры и названия генов / белков расшифровываются при первом упоминании. Подписи к рисункам достаточно информативны.

Во второй главе автор подробно описывает объекты и методы исследования. Охарактеризованы использованные линии и мутанты гороха, а также штаммы клубеньковых бактерий. При выполнении диссертационной работы Серова Т.А. освоила целый ряд современных методов культивирования микроорганизмов и растений, иммунохимии, световой и лазерной конфокальной микроскопии, амплификационного анализа и секвенирования. Особенно следует отметить метод лазерной микродиссекции. Он не только современный и высоко технологичный, но и чрезвычайно трудоёмкий. Только для проведения ОТ-ПЦР, результаты которой представлены на рис. 14, диссертанту пришлось выделить РНК из почти 27000 клеток. Метод микродиссекции был оптимизирован Серовой Т.А. для фиксированных тканей симбиотического клубенька гороха и

дальнейшего проведения экспрессионного анализа из полученного материала.

Результаты исследований приведены в главе 3. Проведение амплификационного анализа, как на уровне целого клубенька, так и его отдельных зон, позволило диссертанту выявить набор генов, кодирующих цистеиновую 15a (*PsCyp15a*) и тиоловую протеазу (*PsTPP*), фактор транскрипции bZIP (*PsATB2*), ферменты биосинтеза этилена (*PsACO1*) и АБК (*PsNCED2*, *PsAO3*) и фермент инактивации ГК (*PsGA2ox1*), экспрессия которых повышалась с увеличением возраста и деградации клеток клубеньков родительских линий дикого типа и мутантов, проявляющих фенотип раннего старения. Изменение экспрессии генов, отвечающих за метаболизм этилена и ГК, соответствовало изменениям АЦК и ГК<sub>3</sub> в тканях клубеньков, детектированным с помощью иммулокализации. Следует отметить высокое качество конфокальных микрофотографий с результатами иммулокализации, представленных в диссертации. В работе продемонстрировано геронтогенное действие этилена на клубеньки и, наоборот, протекторное омолаживающее действие ГК. Интересны результаты об увеличении размеров и ветвлении клубеньков под действием обработки экзогенной ГК<sub>3</sub>.

В следующей главе, которая никак не пронумерована, полученные результаты всесторонне обсуждаются и сопоставляются с уже известными данными. Диссертант предлагает использовать выявленные гены в качестве молекулярных маркеров старения.

Далее следует заключение, в котором Серова Т.А. обобщает обширный экспериментальный материал и приводит оригинальные схемы действия этилена и ГК на старение клубеньков, базирующиеся на полученных ею результатах (рис. 50, 51).

Завершают работу выводы, которые соответствуют цели и задачам работы и полностью основаны на представленных экспериментальных данных.

Список процитированной литературы составляет 306 источников, из которых 12 - в отечественных журналах.

В результате ознакомления с работой возникло несколько вопросов:

- 1) Почему из всех генотипов для лазерной микродиссекции и последующего амплификационного анализа были выбраны пары *Sparkle/sym13* и *SGE/sym27*?
- 2) Если, по мнению диссертанта, протеаза PsCyp1 была активна на более ранних стадиях старения и её транскрипт не детектировался с помощью лазерной микродиссекции в азотфиксирующих и стареющих клетках клубеньков, то тогда почему этот транскрипт выявлялся с помощью конвенционального ОТ-ПЦР анализа в реальном времени на тех же сроках в гомогенатах из клеток соответствующих зон клубеньков как растений дикого типа, так и мутантов?
- 3) Чем, по мнению автора, объясняется низкий уровень ГК по результатам иммулокализации в клубеньках линий *sym40* и *sym33*, различающихся по способности формировать инфекционные капли, если ГК необходимы для выхода бактерий из инфекционных нитей?
- 4) Почему не исследовали действие экзогенной ГК<sub>3</sub> на старение клубеньков мутантных линий гороха?
- 5) Чем был обусловлен набор изучаемых в работе фитогормонов (этилен, АБК, ГК)? И почему не рассматривали действие таких гормонов, как ауксин и цитокинины? Последние заслуженно считаются самыми «антигеронтогенными» гормонами растений.

Следует отметить, что заданные вопросы ни в коей мере не принижают значение результатов, полученных автором и общего положительного впечатления от проведенного исследования.

Работа Серовой Т.А. была апробирована на многочисленных всероссийских и международных конференциях. По теме диссертации опубликовано 17 работ, включая 4 статьи в журналах из перечня ВАК РФ, цитируемых в РИНЦ и других базах данных.

Автореферат полностью отражает основные положения, представленные в диссертации.

Диссертация Серовой Татьяны Александровны «Молекулярно-генетические и физиологические механизмы старения симбиотического клубенька гороха

посевного (*Pisum sativum* L.)), представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является целостной, завершенной научной квалификационной работой, в которой содержатся новые и научно-обоснованные результаты, имеет важное теоретическое и практическое значение. Диссертационная работа и автореферат соответствуют требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а её автор – Серова Татьяна Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Емельянов Владислав Владимирович,  
кандидат биологических наук,  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»  
доцент  
(03.01.05 – физиология и биохимия растений)

Емельянов Владислав Владимирович

199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9.  
тел. +7(812) 36 36 105  
E-mail: v.yemelyanov@spbu.ru

«29» октября 2019 г.

ЛИЧНУЮ ПОДПИСЬ

ЗАВЕРЯЮ

