

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

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Кусакина Петра Глебовича на тему «Анализ регуляции дифференцировки растительных клеток при развитии симбиотического клубенька гороха (*Pisum sativum* L.)», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. «Физиология и биохимия растений»

В результате симбиоза бобовых растений с почвенными азотфиксирующими бактериями формируются новые органы на корнях растения – симбиотические клубеньки, в которых с участием бактериальных симбионтов происходит фиксация атмосферного азота. Выявление механизмов, лежащих в основе дифференцировки клеток растений в ходе развития симбиотических клубеньков, должно способствовать более эффективной селекции форм бобовых растений с более высокими показателями азотфиксации и симбиотической эффективности в целом. К настоящему времени в исследованиях на модельных бобовых растениях, прежде всего люцерны *Medicago truncatula* и лядвенца *Lotus japonicus*, накоплено большое количество данных о регуляции ранних этапов бобово-ризобияльного симбиоза, при этом регуляция более поздних этапов развития симбиотических клубеньков изучена в меньшей степени. Диссертационное исследование Петра Кусакина ставит целью изучение регуляции дифференцировки клеток в ходе развития симбиотических клубеньков у важного для сельского хозяйства бобового растения – гороха посевного. Тремя основными направлениями работы являются проведение транскриптомного исследования клеток различных зон клубеньков, проведение иммуноцитохимического анализа распределения цитокинина в клубеньках гороха, а также сравнительная количественная оценка распределения элементов цитоскелета в неинфицированных и азотфиксирующих клетках клубеньков гороха, а также других представителей бобовых растений.

Диссертационная работа Петра Глебовича Кусакина изложена на 135 страницах, содержит 36 рисунков. Рукопись включает в себя разделы: Введение, Обзор литературы,

Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы (266 источников). Объединение результатов и обсуждения в одном разделе оправдано, поскольку в работе представлены результаты по трем основным направлениям работы, заслуживающим отдельного подробного обсуждения. Однако, с другой стороны, такая структура отчасти приводит к тому, что работа “распадается” на три части: транскриптомный анализ различных зон клубеньков, иммуноцитохимический анализ распределения цитокинина в клубеньках гороха, а также сравнительная количественная оценка распределения элементов цитоскелета, что не способствует ее целостному восприятию. Следует отметить, что работа практически не содержит грамматических ошибок, изложена грамотным языком, легко читается и содержит иллюстрации высокого качества.

Материалы и методы описаны достаточно подробно и полно. Этот раздел дает представление о том, насколько разнообразны и насколько сложны с технической точки зрения методы, используемые автором. Небольшим замечанием к этому разделу является отсутствие указания возраста клубеньков, взятых для анализа элементов цитоскелета у гороха и у других видов бобовых растений.

Раздел «Результаты и обсуждение» написан подробно и хорошо иллюстрирован. К этому разделу есть ряд вопросов и замечаний:

- 1) В разделе 3.1. было бы желательно привести фотографии срезов клубеньков, иллюстрирующих, какие области/группы клеток были взяты с помощью лазерной микродиссекции для последующего транскриптомного анализа.
- 2) При обсуждении данных транскриптомного анализа можно было бы порекомендовать автору более подробно рассмотреть изменения в разных зонах клубенька уровней экспрессии генов, ответственных за биосинтез/передачу сигнала гормона цитокинина, а также генов, регулирующих перестройку компонентов цитоскелета. Это позволило бы в большей степени интегрировать три основных направления работы: транскриптомный анализ, анализ распределения цитокинина и количественную оценку распределения элементов цитоскелета.

Кроме того, этот раздел украсила бы схема, иллюстрирующая основные процессы, которые происходят при дифференцировке клеток в разных зонах клубенька, выявленные при сравнении транскриптомных профилей в разных зонах клубенька.

- 3) Автор отмечает, что в клубеньках мутанта SGEFix--2 (*Pssym33-3*) рибозид транс-зеатина присутствовал в цитоплазме и ядре колонизированных клеток, тогда как в клубеньках дикого типа локализация в ядрах не наблюдалась. Локализация сигнала

в ядре также заметна для клубеньков на Рисунке 22 для клубеньков SGEFix--1 (*Pssym40-1*). Как можно объяснить обнаружение транс-зеатина рибозида в ядрах клеток клубенька у мутантных форм? С какими факторами это может быть связано? Может ли выявление сигнала в ядре быть следствием неспецифичной работы антител при низком уровне цитокининов в анализируемых образцах?

- 4) На основании данных по иммулолокализации цитокининов в клубеньках гороха дикого типа и мутантов автор делает вывод о наличии позитивной регуляции цитокининами выхода бактерий в цитоплазму растительной клетки, дифференцировки бактериоидов и инфицированных клеток клубенька. Однако, данный вывод не вполне правомерен, так как, строго говоря, представленные результаты не позволяют установить причинно-следственные отношения между уровнем цитокининов и дифференцировкой бактериоидов, а показывают лишь наличие связи между этими двумя процессами. Возможным объяснением наблюдаемых результатов может быть и то, что нарушение дифференцировки бактериоидов как таковое может приводить к снижению уровня цитокининов в клетках клубенька.
- 5) Зависят ли параметры распределения микротрубочек и актиновых микрофиламентов от стадии развития клубенька? На каком сроке проводили сравнение организации элементов цитоскелета для клубеньков разных видов бобовых?

Выводы, сделанные диссертантом, в целом отражают полученные результаты. Однако, некоторые формулировки, представленные в выводах, требуют дополнительных разъяснений. Так, автор утверждает, что в процессе дифференцировки клеток клубенька гороха происходит, в том числе, “изменение уровней экспрессии генов ... сигнальных каскадов цитокининов и ауксина”. На основании каких данных автор делает данный вывод? Кроме того, автор утверждает, что “иммуногистохимический анализ цитокининов в клубеньках гороха дикого типа и мутантов, ... выявил позитивную регуляцию цитокининами выхода бактерий в цитоплазму растительной клетки, дифференцировки бактериоидов и инфицированных клеток клубенька, а также негативную регуляцию роста инфекционных нитей и капель”. По мнению рецензента, такая формулировка не является полностью обоснованной (см. п. 4 выше).

Все сделанные замечания носят по большей части рекомендательный характер и не умаляют заслуг диссертанта. В заключении следует отметить, что в целом работа производит очень благоприятное впечатление: она выполнена на высочайшем методическом и техническом уровне, охватывающем методы биоинформатики, клеточной биологии,

микроскопии, иммуногистохимии, а также оригинальные алгоритмы, разработанные автором для количественной оценки элементов цитоскелета. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Все основные результаты работы опубликованы и представлены на конференциях. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Несомненно, что проделанная работа удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Кусакин Петр Глебович заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – «Физиология и биохимия растений»

Официальный оппонент

к.б.н, старший научный сотрудник

кафедры генетики и биотехнологии

Санкт-Петербургского государственного университета

Мария Александровна Лебедева

m.a.lebedeva@spbu.ru,

тел. 8-911-963-68-57

199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

28 марта 2023 года

ЛИЧНУЮ ПОДПИСЬ
Лебедевой М.А.
ЗАВЕРЯЮ



ЗАМЕСТИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ СПбГУ
Н. К. КОРЕЛЬСКАЯ