

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
доктора биологических наук Федоровой Елены Эриковны на тему:
«Эндоплазматическая система клеток корневого клубенька бобовых
растений в условиях азотфиксирующего симбиоза»
по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений
(биологические науки)**

Актуальность темы исследований.

Диссертационная работа Е.Э. Федоровой посвящена исследованию адаптации клеток корневого клубенька к условиям азотфиксирующего симбиоза. Целью работы является выявление молекулярных механизмов модификаций эндоплазматической системы инфицированной клетки, которая обеспечивает поддержание роста и развития симбиотических бактерий и инфицированной клетки в стадии активной азотфиксации.

Взаимодействие бобовых растений и полезных почвенных микроорганизмов в настоящее время является одной из наиболее активно изучаемых областей в физиологии растений. Появление и достаточно долгое поддержание колонии живых азотфиксирующих бактерий в живой клетке эукариота представляет собой значимый биологический феномен для фундаментальной науки с точки зрения важности их роли в росте и развитии растений и эволюционных особенностей симбионтов. Практическая значимость заключается в постоянно возрастающих запросах сельского хозяйства в исследованиях и разработках, направленных на повышение урожайности и качества возделываемых культур, а также снижения потерь от действия неблагоприятных абиотических и биотических факторов. Исследования азотфиксирующего симбиоза создают предпосылки для оптимизации использования этого процесса с целью снабжения растений азотом.

Научная новизна исследования

В работе Федоровой Е.Э. получены результаты приоритетного характера, которые определяют научную новизну диссертации. В частности, впервые показано изменение идентичности мембран симбиосом в процессе их созревания и старения, появление на мембране вакуолярных белков. Проведенное диссертантом

исследование функционального состояния вакуолей в инфицированных и неинфицированных клетках клубенька показало, что развитие бактериальной колонии приводит к дефункционализации вакуолей в инфицированных клетках, освобождая пространство, которое заполняют симбиосомы, и показывает, что причиной этих изменений является изменение паттерна экспрессии генов и локализации белков вакуолярного комплекса HOPS.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования

Исследование маркеров пути секреции и таргетированного мембранного транспорта позволило диссертанту выявить динамику синтеза и источники компонентов мембран для формирования симбиотического интерфейса, роль эндоплазматического ретикулума и генов, которые регулируют уровень синтеза мембран, а также роль цитоскелета в процессе развития симбиоза.

Новые данные о роли транспорта калия в инфицированные клетки, детальный анализ ионного состава симбиосом, цитоплазмы и вакуолей в клетках клубенька, а также иммуноцитохимический анализ распределения белков каналов переносчиков калия позволили диссертанту выявить факт утраты инфицированными клетками белков, участвующих в переносе калия с цитоплазматической мембраны, что приводит к дефициту этого иона и, вероятно, является одной из причин быстрого старения и гибели инфицированных клеток.

Особый интерес представляют полученные диссертантом данные о влиянии стресса, в данном случае засоления, на состояние инфицированных клеток и перераспределение белков, которые участвуют в процессах вывода натрия из клетки, что объясняет высокую чувствительность симбиотической системы к этому стрессу.

Знание выявленных особенностей бобово-ризобияльного симбиоза может послужить ключевым фактором в прикладных работах по повышению его эффективности, в частности, с возможностью отсрочки старения симбиосом и повышения устойчивости инфицированных клеток к солевому стрессу.

Достоверность результатов исследования, степень обоснованности положений, выносимых на защиту, научных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационное исследование выполнено на высоком научно-методическом уровне. Использованы современные цитологические методы, включая методы иммуноцитохимии и электронной микроскопии, генноинженерные, молекулярнобиологические и биоинформатические подходы, обеспечивающие высокое качество данных. Применяемые алгоритмы не вызывают сомнений с точки зрения надежности и достоверности анализа данных. По материалам диссертации опубликовано 36 статей в высокорейтинговых рецензируемых журналах Q1, что подтверждает высокую достоверность полученных результатов. Все научные положения, выносимые на защиту и сделанные выводы обоснованы и логично вытекают из результатов диссертационной работы. Методологические подходы, использованные Федоровой Е.Э., соответствуют решению поставленных задач и детально описаны, что обеспечивает воспроизводимость результатов.

Структура и содержание диссертационной работы

Основная часть исследований выполнена в Институте физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН. Работа построена по классическому плану, содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Рукопись объемом 228 страниц построена по традиционному плану, содержит 67 рисунков и 4 таблицы.

В главе «Введение» отражены актуальность проблемы, степень разработанности темы, цели и задачи исследования, описана научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, перечислены положения, выносимые на защиту, изложена методология исследования.

Глава «Обзор литературы» включает 24 раздела, в которых описана роль биологической азотфиксации, эволюция симбиоза, сигнальный путь факторов нодуляции, и других сигнальных систем, процесс внутриклеточной инфекции, защитные механизмы, участвующие в процессе развития симбиоза, морфология корневых клубеньков. Диссертантом также описана роль фитогормональной регуляции, изменения морфологии инфицированной клетки и цитоскелета. Диссертантом описан процесс формирования симбиосом, роль мембранных маркеров идентичности мембран, процессы транспорта к симбиосомной мембране необходимых компонентов для поддержания бактериальной колонии. Также

описаны процессы терминации симбиотических отношений под действием неблагоприятных условий окружающей среды.

В Главе 2 детально описаны методы исследований, а также растения и бактерии, использованные в работе, условия проведения опытов, методы подбора генов для исследований, способы модификации экспрессии выбранных генов, включая методы трансформации растений. Диссертант также описывает цитологические методы, включая методы иммуноцитохимии и электронной микроскопии.

В Главе 3 описаны результаты экспериментов и дано их обсуждение.

В соответствии с целью работы Е.Э. Федоровой для исследований были выбраны направления модификации эндомембран, происходящие в процессе изменения функционального состояния инфицированной клетки при переходе к азотфиксации, а также прекращения симбиотических отношений при натуральном старении или вследствие неблагоприятных условий. Для диагностики были отобраны гены-маркеры этих изменений. В рамках поставленной цели были сформулированы следующие задачи: 1. Для выяснения условий поддержания внутриклеточной колонии ризобий в симпласте растительной клетки, исследовать молекулярные механизмы, которые предотвращают элиминацию внутриклеточных ризобий на пути слияния с литическими компартментами, а также выявить динамику изменений главного литического компартмента клетки - вакуоли. 2. Провести анализ регуляции процессов транспорта к мембранам симбиотического интерфейса в инфицированной клетке и определить ключевые гены и белки, участвующие в этих процессах. 3. Для выяснения молекулярных механизмов таргетированного мембранного транспорта и перенаправления мембранных компонентов и белков к симбиотическому интерфейсу, исследовать процессы изменения конформации актинового цитоскелета и распределения в инфицированной клетке белков Arp2/3 комплекса, который регулирует нуклеацию белка актина. 4. Выявить механизмы новообразования мембранных компонентов в инфицированной клетке и формирования вектора переноса мембран к симбиосомному интерфейсу, зависящие от Ca^{2+} сенсоров из группы синаптотакминов, участвующих в регенерации поврежденных мембран. 5. Определить источники и стимулирующие механизмы, которые приводят к

избыточному синтезу элементов эндоплазматического ретикулума (ЭР) в инфицированных клетках. 6. Для выяснения причин ускоренного старения инфицированных клеток клубенька и низкой устойчивости клубеньков к солевому стрессу исследовать особенности синтеза и распределения белков ионных каналов шейкерного типа MtAKT1 и MtSKOR/GORK, и транскрипционную активность генов, участвующих в транспорте ионов калия и натрия в корневом клубеньке.

В разделах главы 3 Е.Э. Федоровой представлены экспериментальные исследования процесса формирования симбиосом и изменений в направленности клеточного транспорта белков, принадлежащих к пути эндоцитоза.

Сведения о структуре и количественных характеристиках диссертации, как и основное содержание диссертации, точно отражены в автореферате.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

Выносимые на защиту положения диссертации достаточно подробно обсуждены в публикациях, а также на международных и российских конференциях. По материалам диссертации опубликовано 36 статей в высокорейтинговых журналах, рекомендованных ВАК РФ, индексируемых в международных базах данных и относящихся к первому квартилю (Q1).

Общие вопросы и замечания по работе.

Таким образом, по совокупности характеристик, объему и качеству исследования диссертационная работа Е.Э. Федоровой, несомненно, заслуживает высокой положительной оценки. Принципиальных возражений и замечаний к результатам работы и сделанным выводам нет. Однако, к диссертации имеется ряд замечаний рекомендательного и технического характера.

В обзоре литературы и при обсуждении результатов автор проводит сравнение симбиосом с содержащими бактерии вакуолями в клетках животных, что придает рассматриваемому явлению общебиологический аспект. В этой связи, вероятно, полезно было бы привлечь к сравнению более архаичные примеры эндоклеточного симбиоза, обнаруженные у протист. В последнее время появляется много интересных данных о механизмах длительной персистенции бактерий как в подобных вакуолях, так и непосредственно в цитоплазме и нуклеоплазме многих

представителей этой таксономической группы. Использование этого материала могло бы сделать сравнительный анализ еще более интересным.

В тексте рукописи отмечен ряд опечаток, неточностей и терминологических недочетов. Ниже представлены некоторые из них.

При формулировке задачи 6 использован некорректный термин «экспрессия белков».

Рисунок 6. Из текста рукописи не ясен смысл представленных данных по сравнению экспрессии генов интереса. Ссылка на рисунок дана при обсуждении структуры предположительно кодируемых ими белков. Ни в подписи к рисунку ни в тексте не указан вид растения в качестве объекта. По контексту данные следует отнести к *Medicago truncatula*. Из шкалы рисунка можно понять, что был проведен кОТ-ПЦР анализ, а по характеру диаграммы, что экспрессия целевых генов *MtRab5A1*, *MtRab5A2* и *MtRab5B* в 10-дневных и трехнедельных клубеньках незначительно отличается от соответствующих значений в корне, однако, какая-либо интерпретация представленных данных не приведена.

Рисунок 10. При обсуждении рисунка также не представлено интерпретации данных и не раскрыты задачи эксперимента. Являлось ли это сравнение транскрипционной активности генов в образцах или подтверждение работоспособности рекомбинантной конструкции в трансгенных растениях? В последнем случае, поскольку источником структурных элементов генов служил тот же вид растений, каким образом проводилось дифференцирование экспрессии трансгенных и резидентных генов? В подписи к рисунку неверно указано, что определялась экспрессия малой GTP-азы Rab 7. Вероятно, определялась транскрипционная активность генов малой GTP-азы *Rab7A1* и *Rab7A2*.

Страница 79. В тексте следует давать сначала полное видовое название, а затем сокращенное.

Страница 87, первое предложение. В данном контексте термин «гомология» лучше заменить на «сходство аминокислотной последовательности», а «экспрессия белка» на «синтез белка». Второе предложение: «Гомолог *M. truncatula* белков этого комплекса, MtSYP22, был клонирован и его расположение в клетках корневого клубенька было исследовано с помощью конфокальной микроскопии». Более корректно сформулировать данное предложение следующим образом: «Ген

MtSYP22, как предполагаемый гомолог генов белков этого комплекса у *M. truncatula*, был клонирован, снабжен GFP-тагом и перенесен в трансгенные растения *M. truncatula*. Расположение соответствующего белка в клетках корневого клубенька было исследовано с помощью конфокальной микроскопии».

Страница 95. Использован некорректный термин «экспрессия белков».

Страница 97. Использован некорректный термин «экспрессия промоторов»;

Страница 107. Данная фраза: «Для выявления динамики экспрессии этой группы генов, и их распределения в ткани клубенька при развитии симбиоза...» сформулирована некорректно. Вероятно, имеется в виду сайт/тканеспецифичная экспрессия, либо распределение белковых продуктов генов.

Рисунок 27 – в подписи не указано какой метод использовался для определения экспрессии генов. После рассмотрения данных, представленных на рисунке, остается неясным, о чем они свидетельствуют. В связи с этим, интерпретацию полученных результатов следует расширить. Судя по данным, представленным на рисунке 28, активность промоторов генов *MtVAMP721d* и *MtVAMP721e* проявляет тканеспецифичность по отношению к меристеме клубеньков; кроме того, по утверждению автора, «наблюдалась динамика везикул, несущих белки *MtVAMP721d* и *MtVAMP721e* локально в клеточной области, где происходило формирования симбиотического интерфейса» (Рис. 29). Однако, по данным, представленным на рисунке 27, нельзя сделать вывод о тканевой специфичности либо временной динамике экспрессии этих генов. Каким образом автор может объяснить это несоответствие и были ли другие критерии выбора целевых белков, кроме приведенного анализа экспрессии их генов?

Страница 97 и далее. Некорректное обозначение генетических конструкций: для разделения элементов слитых конструкций следует использовать специфический маркер слияния – двойное двоеточие «::».

Принятое разделение номенклатуры белков и генов, с выделением названий генов курсивом, не всегда соблюдается. Данные неточности отмечены на страницах 16, 82, 96, 97, 106, 128, 129, 151, 152, 165, 169, 172-176, 178, 181, 185.

В рукописи отмечены неточности в описании рисунков. В качестве примеров можно указать следующее.

Рисунки 19, 20. В подписи к рисунку отсутствует расшифровка обозначений «ИК», «Н» на рисунке. Подпись к рисунку 23 – перепутаны варианты Б и В. Несовпадения подписи с обозначениями на изображении отмечены также для рисунков 29, 45, 47, 49, 50, 61, 64, 65.

Отмеченные недочеты присутствуют в также соответствующих материалах автореферата.

Данные замечания не являются принципиальными и не умаляют несомненных достоинств диссертационной работы. Проведенный автором анализ изменений эндомембранной системы корневых клубеньков и роли ряда генов в этих процессах вносит существенный вклад в понимание изменений клетки-хозяина, которые позволяют поддерживать колонию азотфиксирующих симбиосом в течение достаточно продолжительного времени. Диссертант предложила новую и достаточно полную концепцию регуляции изменения эндомембранной системы в клетках, которые объясняют возможности адаптации клетки растения к поддержанию бактериальной колонии. Результаты работы Е.Э. Федоровой могут найти применение в дальнейших научных исследованиях, в лекционных курсах для студентов, а также потенциально в создании искусственных природоподобных систем.

Заключение.

На основе изложенного выше можно заключить, что представленная диссертационная работа Федоровой Елены Эриковны «Эндомембранная система клеток корневого клубенька бобовых растений в условиях азотфиксирующего симбиоза» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Федорова Елена Эриковна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биологические науки).

Официальный оппонент: доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной биологии КИББ ФИЦ КазНЦ РАН (трудовой договор)

ГОГОЛЕВ Юрий Викторович

06.05.2026

Контактные данные: тел.: , e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 1.5.21 – Физиология и биохимия растений

Адрес места работы: 520088, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Академика Арбузова, д. 8, Литера Р, Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН); Тел: ; e-mail:

Подпись сотрудника ФИЦ КазНЦ РАН Ю.В. Гоголева удостоверяю:

« 06 » 05 20 26 г.

Согласен на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных при работе диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по диссертационной работе Федоровой Елены Эриковны «Эндоплазматическая система клеток корневого клубенька бобовых растений в условиях

азотфиксирующего симбиоза», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биологические науки).

Гоголев Юрий Викторович