

## Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Киричека Евгения Андреевича «Симбиотическая совместимость штаммов *Rhizobium laguerreae* и гороха посевного (*Pisum sativum* L.)», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности:

1.5.11. Микробиология.

### **Актуальность темы исследования**

Диссертация посвящена изучению механизмов и условий симбиотической совместимости штаммов клубеньковых бактерий с бобовым растением. Проблема обнаружения, а быть может и создания наиболее оптимального штамма клубеньковой бактерии для инокуляции бобовой культуры будоражило умы ученых в течение долгих десятков лет и является вполне актуальной и по сей день. Этому есть веская причина, бобово-ризобийный симбиоз имеет колоссальное хозяйственное значение для сельского хозяйства. Обнаружение штамма, который бы при любых условиях проявлял наибольшую симбиотическую эффективность могло бы значительно повысить эффективность возделывания бобовых культур. Поэтому данная работа, посвященная изучению того, как растение отвечает в ответ на заражение штаммами ризобий разной совместимости является весьма актуальной, поскольку может дать возможность глубже понять суть этой проблемы и вероятно со временем позволит конструировать или управлять взаимодействиями клубеньковых бактерий и бобовых растений, получая наибольшую пользу для формирования урожая сельхозкультур.

### **Теоретическая и практическая значимость результатов работы**

Теоретическое значение данной работы связано с тщательным исследованием морфологического ответа бобового растения на заражение разными штаммами клубеньковых бактерий, характеризующихся индивидуальными симбиотическими фенотипами. Показаны различные варианты ответов растения при формировании морфологии клубенька в ответ на взаимодействие со штаммами разной эффективности. Это особенно важно в свете того, что почва изобилует огромным количеством разнообразных штаммов клубеньковых бактерий и растению приходится в начале каждой вегетации проводить их отбор в зависимости от их эффективности. Поскольку растение заранее не способно предугадать качество микросимбионта, то ему необходимо использовать механизмы, связанные с

подавлением развития неудачных вариантов клубеньков, что диссертантом и было изучено.

Любые исследования, связанные с изучением бобово-ризобияльного симбиоза, так или иначе имеют практическое значение, поскольку связаны с пониманием процессов взаимодействия клубеньковых бактерий и бобовых растений, союз которых имеет огромное значение для сельского хозяйства ввиду прямой связи с урожайностью бобовых культур. Данная работа не исключение и в ней теоретическая проработка проблемы совместимости как раз направлена на дальнейшее использование в практике при подборе наиболее эффективных симбиозов.

### **Научная новизна, обоснованность и достоверность научных положений, выводов, сформулированных в диссертации**

Диссертация основана на обширном экспериментальном материале, выполнена на высоком научном уровне с использованием современных методов и тщательным анализом данных, что обеспечивает достоверность полученных результатов.

В качестве научной новизны хотелось бы отметить то, что в данной работе впервые для симбиотической системы, *R. laguerreae* – горох посевной, методом цитологического анализа были описаны гистологические и ультраструктурные нарушения процессов инфекции и клубенькообразования. Показано влияние не только штамма бактерии, но и сорта растения-хозяина на характер образования клубенька и формирование аномалий их развития. Для изученных штаммов бактерий был впервые выявлен факт активации защитных реакций в клубеньках как на структурном, так и транскрипционном уровнях. Впервые был проведен анализ локализации пектинов, гемицеллюлозы, арабиногалактановых белков, суберина и каллозы, а также бактериальных липополисахаридов в клубеньках, сформированных при взаимодействии гороха посевного с исследуемыми штаммами.

Работа представляет собой комплексное исследование влияния штаммов клубеньковых бактерий разной совместимости на формирование морфологии клубеньков на корнях растения-хозяина. Высокая достоверность полученных результатов обеспечена использованием современных методов анализа и статистической обработки полученных результатов. В работе широко применялись различные способы микроскопического анализа, такие как просвечивающая электронная микроскопия, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Активно применялся иммуноцитохимический

анализ с использованием значительного набора антител, полученных к различным структурным компонентам клубенька. Это все позволило визуально оценить особенности развития данных структур при различных комбинациях взаимодействия «сорт растения-штамм бактерии», а также в зависимости от внешних факторов. Результаты работы широко были представлены на различных научных конференциях.

### **Характеристика разделов работы**

Диссертация написана в научном стиле, текст логичен и структурирован. Оформление соответствует классическому стилю и требованиям ВАК.

Работа изложена на 164 страницах и включает 27 рисунков и 5 таблиц. Она состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание объекта и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы, а также приложения, включающего 18 дополнительных иллюстраций.

Цели и задачи исследования четко сформулированы и соответствуют заявленной теме.

Литературный обзор написан лаконично, но вполне достаточном объеме для возможности введения читателя в курс дела. В нем собраны данные по всем разделам диссертации, для лучшего восприятия информации, изложенной в данном разделе материал хорошо иллюстрирован. Об основательном подходе к подготовке данного раздела диссертантом говорит список цитируемой литературы, состоящий из 373 наименований.

В разделе «Материалы и методы» описаны объекты исследования и методики проведения работ. Описание методов дает возможность полноценно оценить ход проведения опытов. Методы, используемые в работе современные, гарантирующие получение достоверных результатов. Необходимо отметить, что диссертант привлек в работу ряд сложных разнонаправленных современных методов, таких как полногеномное секвенирование и различные варианты микроскопии с иммуноцитохимическим анализом, что говорит о его высокой методической подготовленности. Тем не менее, хотелось бы в данном разделе увидеть описание способа инокуляции растений, поскольку это может иметь важное значение при формировании клубеньков и более точно оценить их возраст.

В разделе «Результаты и обсуждение» диссертант подробно и последовательно объясняет ход исследований. Первая подглава посвящена анализу филогенетических связей между штаммами *Rhizobium laguerreae*, где

автор с использованием современного инструментария на основе генетической систематики описывает филогенетическое положение образцов. Было показано что исследуемые штаммы относятся к геновидам N, R и O в пределах комплекса видов *R. leguminosarum*.

В следующей подглаве «Влияние генотипа хозяина» диссертант исследовал сортовую специфичность и штаммоспецифичность, определяющие наблюдаемые аномалии развития симбиотических клубеньков гороха сортов Frisson и Rondo, а также лабораторной линии SGE.

В подглаве «Влияние генотипа микросимбионта» описано проведение анализа локализации пектинов, гемицеллюлозы, арабиногалактановых белков, суберина и каллозы, а также бактериальных липополисахаридов в симбиотическом интерфейсе, сформированном горохом посевным и шестью анализируемыми штаммами *R. laguerreae*.

В целом диссертация написана хорошим литературным языком и очень хорошо иллюстрирована. Особо хочется отметить, что в работе был задействован набор современных методов, опыты проведены на высшем методическом уровне. Достоверность полученных результатов не вызывает никаких сомнений. В обработке данных задействован целый ряд биоинформатических программ. Работа оставляет очень хорошие впечатления.

Но тем не менее хотелось бы задать несколько вопросов и оставить некоторые пожелания.

1. Первый вопрос связан с термином «совместимость». В своей работе диссертант пишет «В контексте данной работы под симбиотической совместимостью будет подразумеваться способность конкретных генотипов ризобий и генотипов бобовых растений взаимодействовать друг с другом на протяжении всего процесса формирования симбиоза.». Совместимыми будут все штаммы, которые смогли формировать клубенек? Не зависимо от эффективности? Если зависимость такая существует, то как она будет влиять на совместимость, по принципу чем эффективнее, тем совместимее?
2. Почему в работе задействованы именно эти штаммы, полученные в Испании? Это был случайный выбор, или в этом была определенная идея?
3. В 6-ом пункте задач написано «Оценить влияние условий изменяющейся окружающей среды на процесс клубенькообразования и гистологическую структуру клубеньков, индуцированных на растениях гороха посевного сорта Rondo шестью штаммами *R. laguerreae*.» Думаю

«условий изменяющейся окружающей среды» для задачи слишком широкое понятие.

4. На 54-ой странице есть утверждение «Согласно Genome Taxonomy Database (GTDB) штаммы AMPS04, AMPS17, AMPS23, AMPS05 и AMPS34 получили таксономический статус *Rhizobium laguerreae*, а штамм — *Rhizobium leguminosarum\_Q*.» Но согласно рисунку 10 «Основанные на данных полногеномного секвенирования...» штаммы AMPS05 и AMPS34 находятся ближе к AMPS22, чем к штаммам AMPS04, AMPS17, AMPS23? Также на рисунке 10 было бы логично указать границы F-клады, иначе приходится только догадываться.
5. На 81-ой странице есть утверждение «В целом, дегенерацию симбиотических структур можно рассматривать как введение санкций со стороны растения-хозяина, при которых ассоциации с неэффективными партнерами abortируются». В связи с этим вопрос, только ли с неэффективными?
6. Автор пишет «Кроме того, штаммы AMPS04, AMPS17 и AMPS23, по-видимому, не способны осуществлять биосинтез УДФ-N-ацетил- $\alpha$ -D-хиновозамина (идентификатор BioСус: PWY-7334), также связанного с модификацией O-антигена.». Из чего следует данное утверждение или это определенная догадка?
7. И самое основное даже не замечание, а скорее всего больше пожелание. Автор посвятил целую главу на определение филогенетических положений исследуемых штаммов методом генетической систематики путем расчета значений ANI и OrthoANI, что не имеет никакой информативности о симбиотических характеристиках этих штаммов на уровне их эффективности\совместимости. Было бы, на мой взгляд, более информативным имея полногеномные сиквенсы штаммов сравнить их симбиотические части, хотя бы представленность генов и их синтению. Вот это можно связать с эффективностью, геномную филогению только отчасти или почти нет.

В целом, работа оставляет очень приятные впечатления и, по моему мнению, заслуживает очень высокой оценки. Соискатель продемонстрировала большой объём экспериментальной работы, глубину анализа и навыки биоинформационного анализа. Содержание автореферата соответствует основным положениям и выводам диссертации. Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.11. – «Микробиология».

