

**МИНОБРНАУКИ РОССИИ**

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки

«Федеральный исследовательский центр  
«Пушкинский научный центр биологических  
исследований Российской академии наук»  
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)

142290, Московская область, г.о. Серпухов, г. Пушкино,  
проспект Науки, д.3.  
Тел./факс: (4967)73-26-36, e-mail: info@pbcras.ru,  
https://www.pbcras.ru  
ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983,  
ИНН/КПП 5039002841/503901001

23.04.2026 № 191-01/401

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

УТВЕРЖДАЮ: ]

Директор ФИЦ ПНЦБИ РАН

  
П.Я. Грабарник  
«23» апреля 2026 г.  


**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» 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 исследования.** Диссертационная работа Киричека Евгения Андреевича относится к категории фундаментальных исследований в области «симбиологии» и имеет важное практическое значение для разработки эффективных микробных препаратов. Работа посвящена исследованию феномена симбиотической совместимости микро- и макросимбионтов на примере шести штаммов *Rhizobium laguerreae* и трех сортов гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Понимание механизмов совместимости генотипов бактерий и растений-хозяев, итогом которой является формирование азотфиксирующего бобово-ризобиального симбиоза, лежит в основе селекции перспективных штаммов-инокулятов, создания устойчивых симбиотических систем и повышения продуктивности бобовых культур. Таким образом, актуальность исследований не вызывает сомнений.

**Научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов диссертации.**

В ходе работы автором проведено полногеномное секвенирование шести штаммов *Rhizobium laguerreae* AMPS, выделенных из клубеньков гороха в Испании, и установлена их принадлежность к геновидам N, R и O в пределах видового комплекса *R. leguminosarum*.

В системе *R. laguerreae* – горох посевной (три генотипа) охарактеризованы гистологические и ультраструктурные аномалии инфекции и органогенеза клубеньков, обусловленные генотипами обоих партнеров. Обнаружена сортовая и штаммоспецифичность: лабораторная линия гороха SGE проявляла высокую избирательность, активируя защитные реакции против неэффективных штаммов, тогда как сорт Rondo формировал эффективные клубеньки с большинством изученных штаммов. Показано, что неэффективный симбиоз коррелирует с нарушениями в локализации ключевых компонентов симбиотической поверхности взаимодействия – арабиногалактановых белков и каллозы и зависит от структуры липополисахаридов ризобий. Установлено, что факторы внешней среды способны модифицировать симбиотическую эффективность штаммов *R. laguerreae*: развитие инфекционных структур и симбиосом у AMPS23 усиливалось, а у AMPS34, напротив, подавлялось под их воздействием. Данные о влиянии условий среды на формирование азотфиксирующих клубеньков обосновывают необходимость экологического тестирования препаратов перед их широким внедрением в сельскохозяйственную практику.

Работа, безусловно, имеет практическое значение и вносит существенный вклад в развитие и усовершенствование подходов к созданию высокоэффективных инокулятов гороха посевного и повышения продуктивности бобовых – ценных пищевых и кормовых культур.

**Объем, содержание и оформление диссертации.** Диссертация Киричека Евгения Андреевича «Симбиотическая совместимость штаммов *Rhizobium laguerreae* и гороха посевного (*Pisum sativum* L.)» изложена на 164 страницах, построена по стандартному образцу и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», а также «Приложение». Список литературы включает 373 источника. Диссертация содержит 5 таблиц и 27 рисунков, которые демонстрируют большой объем экспериментальной и аналитической работы, проделанной автором.

**Во введении** изложены цели и задачи исследования, которые по своей значимости, безусловно, соответствуют уровню исследований кандидатской диссертации. Обоснована актуальность работы, а также отмечены ее новизна и прикладное значение для совершенствования агротехнологий и обеспечения продовольственной безопасности в рамках концепции устойчивого развития. Продемонстрирована связь работы с научными программами и показан личный вклад соискателя в решение поставленных задач.

**Обзор литературы** написан на 42-х страницах преимущественно по материалам публикаций за последние годы. В обзоре дана общая характеристика представителей семейства *Rhizobiaceae* и рассмотрены различные аспекты формирования бобово-ризобияльного симбиоза. В целом, обзор отражает современное состояние проблемы и свидетельствует о широкой эрудиции автора в данной области исследований.

В разделе **«Материалы и методы»** достаточно детально описаны использованные методы исследования, позволяющие, при необходимости, достоверное воспроизведение полученных результатов. Следует отметить, что выбор методов является оптимальным с точки зрения решения поставленных в работе задач. В работе использованы современные методы молекулярной микробиологии, биоинформатики, иммуноцитохимии, электронной и конфокальной микроскопии. В этой же главе описаны условия проведения экспериментов с растениями. Совокупность использованных комплементарных подходов позволяет заключить, что диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне, и свидетельствует о достоверности результатов.

Раздел **«Результаты и обсуждение»** представлен на 54 страницах и, по сути, отражает решение нескольких последовательных и логически связанных задач.

Первая из них касается секвенирования геномов шести штаммов *Rhizobium laguerreae* AMPS – симбионтов гороха. В результате филогенетического анализа уточнено таксономическое положение исследуемых штаммов в пределах комплекса видов *R. leguminosarum*. Показано, что штамм AMPS22 принадлежит к геновиду N, штаммы AMPS04, AMPS17 и AMPS23 – к геновиду R, а штаммы AMPS05 и AMPS34 – к геновиду O.

Большой объем работы посвящен гистологической и ультраструктурной организации клубеньков, образующихся при инокуляции трех сортов гороха посевного штаммами *Rhizobium laguerreae* различных генотипов. В результате для конкретной пары микро- и макросимбионта впервые были выявлены нарушения процессов инфекции и клубенькообразования, приводящие к формированию неэффективного симбиоза. Показано, что данные нарушения связаны с изменениями структуры инфекционных нитей и биогенеза симбиосом. Последующий иммуноцитохимический анализ клубеньков с использованием специфических антител позволил определить локализацию растительных пектинов, гемицеллюлозы, арабиногалактановых белков, суберина, каллозы и бактериальных липополисахаридов в симбиотическом интерфейсе. Выявлено аномальное расположение компонентов симбиотической поверхности взаимодействия:

арабиногалактановых белков, арабиногалактанпротеин-экстенсина матрикса инфекционных нитей и каллозы.

Заслуживают внимание полученные в работе данные по дифференциальной экспрессии генов гороха в клубеньках, индуцированных наиболее эффективным штаммом AMPS05 и неэффективным штаммом AMPS04. Показано, что при инокуляции растений гороха несовместимым штаммом AMPS04 наблюдается повышение уровней экспрессии генов, вовлеченных в защитные реакции растения-хозяина, и понижение уровней экспрессии генов, участвующих в органогенезе клубеньков.

Совокупность полученных в работе данных позволила автору вполне обоснованно предложить критерии, которым должна отвечать полная совместимость симбионтов.

**Публикации.** По результатам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК и индексируемых в международных базах Web of Science и/или Scopus. Во всех статьях Киричек Е.А. является первым автором. Результаты диссертации представлены также в виде шести опубликованных тезисов и доложены на отечественных и международных конференциях.

#### **Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания.**

К диссертационной работе нет замечаний принципиального характера. Все полученные в ходе работы результаты детально изложены в тексте диссертационной работы и проиллюстрированы соответствующими рисунками и таблицами. Высокое качество иллюстраций, применение большого арсенала современных и взаимодополняющих методов позволило получить диссертанту достоверные результаты и сделать на их основании обоснованные выводы. Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы. Однако при прочтении работы возникли следующие **вопросы**.

1. Что явилось основанием для выбора и исследования штаммов, выделенных и описанных в 2015 г. в Испании, в настоящей работе?
2. В экспериментальной работе Flores-Félix et al. (2020) показано, что все шесть исследуемых штаммов демонстрировали высокую эффективность в симбиозе с горохом сорта Rondo, что коррелировало с увеличением веса инокулированных растений и содержанием в них азота. Авторы делают вывод, что «...штаммы *R. laguerreae* sv. *viciae* являются перспективными кандидатами для биоудобрения этой культуры во всем мире». Тем не менее, по данным диссертационной работы, только при инокуляции штаммом AMPS05 наблюдалось достоверное увеличение содержания

азота в растениях того же сорта. При использовании штаммов AMPS04 и AMPS23 у растений были выявлены признаки азотного голодания. Как Вы объясняете данное противоречие?

3. Выполняли ли фильтрацию сырых прочтений перед сборкой данных ONT? Если да, то по каким параметрам?
4. Указано, что сборку выполняли только из данных ONT с последующей коррекцией инструментом Medaka. Почему был выбран именно этот способ, а не генерация данных NGS (Illumina, MGI, etc) и последующая сборка гибрида с корректировкой, например, инструментом Pilon?
5. Как выполняли верификацию концов элементов?
6. В геноме штамма *Rhizobium laguerreae* WSM1455 (GCA\_021052325.1) самые большие репликоны – это хромосома и плазида (размер 4.8 и 1.0 млн. п.н., соответственно), топология обоих репликонов определена как кольцевая. В геномах изучаемых штаммов присутствуют контиги близкого размера, их топология обозначена как линейная. Пожалуйста, поясните, это именно результат сборки или же линейная топология подтверждена иными методами, например, с помощью альтернативных программ (например, Canu, NECAT)?
7. Согласно метрикам Genbank, полнота сборок геномов штаммов AMPS34 и AMPS05, рассчитанная посредством CheckM, составляет 89.23 и 90.21% соответственно. Это ниже, чем указано в Таблице 2 (стр. 55), и, в целом, ниже общепринятых порогов (95%). С чем Вы это связываете?
8. Депонированы ли данные РНК-секвенирования?

**Замечания.** Нельзя не указать на ряд недочетов.

Следует отметить некорректную подпись к рисункам по иммуноцитохимии: «...**моноклональные вторичные антитела IgG козы против крысы конъюгированное с AlexaFluor 488**». Вторичные антитела не являются моноклональными, это ошибка, повторяющаяся во всех подписях к рис. 20–24 и рис. 8–12 в «Приложении». Правильное написание – «Для иммунолокализации использовали конъюгированные с AlexaFluor 488 вторичные антитела IgG козы против иммуноглобулинов крысы». Если все указанные в таблице 1 антитела являются моноклональными, следовало бы указать это в названии таблицы: «Таблица 1 – **Первичные моноклональные антитела, используемые в работе**».

В «Материалах и методах» (стр. 44) указан штамм *Rhizobium ruizarguesonis* RCAM1026, однако, далее в тексте упоминание о нем отсутствует.

Стр. 37, 38 – «вследствие» пишется слитно, а не «в следствие», стр. 43, 53 – следует писать «посредством», а не «по средствам». На стр. 76 отсутствует год в ссылке на работу Welmillage et al.

Высказанные замечания не снижают высокой оценки работы и высокого уровня проведенного исследования.

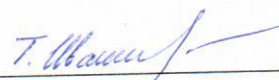
**Заключение.** Таким образом, диссертация Киричека Евгения Андреевича «Симбиотическая совместимость штаммов *Rhizobium laguerreae* и гороха посевного (*Pisum sativum* L.)», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – Микробиология, является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, имеющее важное хозяйственное значение. По актуальности, новизне и достоверности полученных результатов, обоснованности сделанных выводов, научной и научно-практической значимости работа «Симбиотическая совместимость штаммов *Rhizobium laguerreae* и гороха посевного (*Pisum sativum* L.)», отвечает требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред.), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор этой работы, Киричек Евгений Андреевич, заслуживает присуждения ему искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – Микробиология.

Отзыв был обсужден и утвержден на совместном заседании лаборатории молекулярной микробиологии, лаборатории биологии плазмид и лаборатории физиологии микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» 27 апреля 2026 года, протокол № 4:

Ведущий научный сотрудник  
Лаборатории молекулярной микробиологии  
Института биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН –  
обособленного подразделения Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки  
«Федеральный исследовательский центр  
«Пушкинский научный центр биологических  
исследований Российской академии наук»,

кандидат биологических наук  
E-mail: ivashina@ibpm.ru  
Тел.: +7 (909) 1688410

Ивашина Татьяна Владимировна

  
\_\_\_\_\_

Старший научный сотрудник  
Лаборатории биологии плазмид  
Института биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН –  
обособленного подразделения Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки  
«Федеральный исследовательский центр  
«Пущинский научный центр биологических  
исследований Российской академии наук»,  
кандидат биологических наук  
E-mail: to\_anohina@rambler.ru  
Тел.: +7 (926) 1365746

Анохина Татьяна Орестовна

  
\_\_\_\_\_

Старший научный сотрудник  
Лаборатории физиологии микроорганизмов  
Института биохимии и физиологии  
Микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН –  
обособленного подразделения Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки  
«Федеральный исследовательский центр  
«Пущинский научный центр биологических  
исследований Российской академии наук»,  
доктор биологических наук

E-mail: y.delegan@yandex.ru  
Тел.: +7(961)261-99-71

Делеган Янина Адальбертовна

  
\_\_\_\_\_

  
Иванова И.В., Анохина Т.О.  
Делеган Я.Ф.