

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 003.047.01  
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ  
НАУКИ СИБИРСКОГО ИНСТИТУТА ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ  
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК**

аттестационное дело № \_\_\_\_\_  
решение диссертационного совета от 17.03.2022 г., № 5

о присуждении **Гончаровой Алене Михайловне** (Российская Федерация) ученой степени кандидата биологических наук.

**Диссертация** «Влияние бактериальных патогенов и мутуалиста на активность компонентов аденилатциклазной сигнальной системы и ее взаимосвязь с уровнем пероксида водорода в проростках гороха» по специальности 1.5.21. – «физиология и биохимия растений» принята к защите 13 января 2022 года, протокол №2, диссертационным советом Д 003.047.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, д. 132, а/я 317), приказ о создании №105/нк от 11 апреля 2012 г.

**Соискатель** Гончарова Алена Михайловна, 1987 года рождения, с 2019 и по настоящее время работает в должности ведущего инженера в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН.

**Диссертация выполнена** в лаборатории физиологии устойчивости растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН.

В 2009 году соискатель закончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Иркутский государственный университет. В 2015 году поступила в очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, которую завершила по собственному желанию (семейным обстоятельствам) в 2019 году.

**Научный руководитель** – Ломоватская Лидия Арнольдовна, доктор биологических наук (1.5.21 – физиология и биохимия растений), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, главный научный сотрудник лаборатории физиологии устойчивости растений.

**Ведущая организация** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии"

(ФБГНУ **ВНИИСХМ**) в своем **положительном заключении**, подписанном Долгих Еленой Анатольевной, доктором биологических наук (1.5.21 – физиология и биохимия растений и 03.02.03 - микробиология) и утвержденном директором института д.б.н. Николаем Александровичем Проворовым отмечают, что диссертационная работа «Влияние бактериальных патогенов и мутуалиста на активность компонентов аденилатциклазной сигнальной системы и ее взаимосвязь с уровнем пероксида водорода в проростках гороха» по актуальности темы, новизне полученных результатов теоретической и практической значимости результатов отвечает всем требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г. (со всеми изменениями, включительно по 2021

год), а ее автор, Гончарова Алена Михайловна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. – физиология и биохимия растений. Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании Ученого Совета Федерального государственного бюджетного научного учреждения

Всероссийский научно-

исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, протокол № 1 от 15 февраля 2022 года.

#### **Замечания в отзыве ведущей организации.**

1. Автор часто упоминает о лектинах, как о возможных рецепторах к NF. Это неверно, поскольку рецепторами к этим сигнальным молекулам ризобий являются LysM-мотивы содержащие рецептор-подобные киназы (LysM-РПК), что установлено на основании изучения мутантов растений, не восприимчивых к NF, а также при непосредственном анализе связывания выявленных рецепторов с лигандом. 2. Возможность «узнавания» NF CERK1-подобным рецептором LYK9 имеет неспецифичный характер, из-за того, что остовом Nod-факторов являются хитоолигосахариды. Следовало отметить данную особенность в «Обзоре литературы» и при обсуждении результатов. 3. В разделе «Мат. и методы» было бы полезным добавить – как непосредственно проводили обработку бактериями и экзогенными веществами проростков гороха. 4. Автор указывает на значительную активацию тАЦ и рАЦ под влиянием неспецифичного патогена *Clavibacter sepedonicus* (Cs) на сроке 5 и 15 минут после инокуляции, связывая это, главным образом, с выделением экзополисахаридов (ЭПС), влияющих на изменение pH внеклеточной среды. Автор предполагает, что восприятие патогена происходит без участия рецепторов (стр. 67). Следовало отметить, что активация тАЦ и рАЦ может быть связана с развитием сильного иммунного ответа при взаимодействии этого патогена с растениями гороха на ранних стадиях. Для специфичного патогена *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Psp) сильный иммунный ответ может не развиваться из-за выделения эффекторов. 5. Рис. 16 - не представлены результаты статистического анализа. 6. В результатах влияния ингибитора сурамина автор упоминает о возможном опосредованном действии цАМФ на активность кальциевых каналов. Проводились ли какие-либо эксперименты с использованием ингибиторов кальциевых каналов или планируются ли они? 7. Несколько структурировать текст при обсуждении результатов, что вероятно связано с большой увлеченностью автора полученными результатами.

#### **Официальные оппоненты.**

1. Максимов Игорь Владимирович, доктор биологических наук (1.5.21 – физиология и биохимия растений), профессор, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, заведующий лабораторией биохимии иммунитета,
2. Емельянов Владислав Владимирович, кандидат биологических наук (специальность 1.5.21 – физиология и биохимия растений), Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», доцент кафедры генетики и селекции

**дали положительные отзывы о диссертации.**

#### **Замечания в отзыве официального оппонента д.б.н., проф. И.В. Максимова.**

1. Нет подкрепления ни ссылкой на литературные данные, ни на собственные экспериментальные, что действительно штамм *R. leguminosarum* bv. *vicea* (Rlv) RCAM 1022 эффективен по азотфиксации или формированию азотфиксирующих клубеньков. По рис. 2 автореферата видно только то, что коэффициент адгезии клеток этого штамма выше, чем у других использованных в эксперименте штаммов. Считаю, что высокий коэффициент

адгезии клеток штамма на поверхность корней гороха никак не может быть связан с эффективностью азотфиксации. Точно также, никак не подкреплено утверждение, что штаммы RCAM 1064 и RCAM 1065 неэффективны и, отдельно, высококонкурентны. 2. В обзоре автор упоминает, что «единственный вид в составе данного рода, *Clavibacter michiganensis*, в зависимости от растения-хозяина и симптомов заболевания, разделяется на шесть подвидов» среди которых есть подвид *Cs*, вызывающий кольцевую гниль у картофеля и подвид *Clavibacter michiganensis* spp. *phaseoli* subsp. nov., вызывающий гнили у бобовых. Мне понятно, что штамм *Cs* 6889 был использован диссертантом как неспецифический в экспериментах. Может ли диссертант сказать что-либо о том, как бы физиологически повели бы себя корни гороха на инфицирование штаммом подвида *C. phaseoli*, специфическим к бобовым. 3. В разделе 3.2 автор описывает изменения в активности ТАЦ и РАЦ в корнях гороха. На рис. 9 дисс. (рис 4 автореф.) показано, что активность этого фермента при инфицировании штаммом *Cs* 6889 резко повышается уже на 5 мин и поддерживается до 15 мин эксперимента. Не понятно, почему на 120 мин и 360 мин эксперимента нет данных по активности фермента в корнях, инфицированных этой бактерией. Не обнаружил в разделе данных по активности аденилатциклаз в контрольных образцах, относительно чего в последствии были проведены вычисления и построены графики. В каких единицах измерялась активность аденилатциклаз? В целом, такое же замечание касается подраздела 3.6. 4. В разделе 3.3 автор отмечает, что по содержанию цАМФ отрезки анализируемого корня «незначительно отличалось во всех участках, за исключением I зоны (меристемы), где данный показатель был выше (табл. 2)». И эти данные «В дальнейших экспериментах служили контролем». Но, при анализе таблицы 2 обнаружилось, что в ней речь ведется о содержании  $H_2O_2$ . Контрольные цифры по уровню цАМФ были обнаружены мной в табл. 3 и 4 дисс., касающихся экспериментов по использованию экзогенных концентраций цАМФ (табл. 3) и сурамина (табл 4). В каких единицах измеряли концентрацию цАМФ. В таблице 3 нет данных по этому вопросу. Они есть только в таблице 4. 5. В некоторых случаях не указали в подрисуночных надписях и в таблицах конечную точки фиксации, где были сняты результаты. Приходится догадываться о дате наблюдений, представленных в наглядном материале, так как это время есть только в тексте диссертации (например, табл. 3 - вероятно 15 мин эксперимента, рис. 15 вероятно 5 мин). 6. При первом упоминании вида организма следует дать полную расшифровку вида, а затем сокращение, а не наоборот. 7. В обзорной части, а также при обсуждении полученных данных автор часто забывает о соблюдении хронологии - следует всегда впереди указывать более ранние работы, а затем более современные. 8. В ходе анализа дисс. и автореф. обнаружил, что есть различия в тексте по разделу «Апробация работы». В дисс. указано, что автор работы апробировала ее в международной научной конф. «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», «PLAMIC2018» (Уфа, 13–17 июня 2018 г.). Всероссийской научной конф. «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды», VIII съезде общества физиологов растений России, (Иркутск, 10–15 июля 2018), Всероссийской научной конференции «Физиология растений – основа создания растений будущего», IX съезд Общества физиологов растений России, (Казань, 19–21 сентября 2019 г.). В то же время, в автореф. указано, что материалы диссертации были представлены только на VI конференции «ЭкоБиоТех 2019». В автореф. в списке научных трудов не показано, что автором опубликованы тезисы (а это тоже научные труды) докладов, подтверждающих, что действительно автор апробировала свою работу на этих конференциях.

#### **Замечания в отзыве официального оппонента к.б.н. В.В. Емельянова.**

1. В чём состоит «специфичность» ответа аденилатциклазной сигнальной системы корня гороха на инфицирование эффективным штаммом клубеньковых ризобактерий? 2. В чём заключаются принципиальные различия между зоной зачатков корневых волосков (II) и зоной молодых корневых волосков (III)? Для удобства рисунок 5 дисс., отражающий

зональность корня можно было бы вставить в виде вкладки во все экспериментальные рисунки с данными, что значительно облегчило бы восприятие излагаемого материала. 3. Почему в качестве хозяин-специфичного патогена выбрали паразита филлосферы *Psp*, а не какого-либо корневого фитопатогена? Чем обусловлен выбор в качестве хозяин-неспецифичного патогена возбудителя болезни картофеля *Cs*, а не фитопатогенов родственных гороху бобовых *C. michiganensis* ssp. *insidiosus* или *C. michiganensis* ssp. *phaseoli*? 5. Насколько релевантно было оценивать действие перекиси водорода на активность аденилатциклаза не в очищенном виде, а в гомогенате? В нём содержится много примесей низкомолекулярных про- и антиоксидантов, включая дитиотрейтол, а также про-/антиоксидантных ферментов.

**Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в данной отрасли науки по специальности защищаемой диссертации.** В ведущей организации ФГБНУ ВНИИСХМ работают специалисты, выполняющие фундаментальные научные исследования в области физиологии и биохимии растений, изучающие механизмы сигнального обмена между растениями и почвенными микроорганизмами при развитии мутуалистических и антагонистических взаимоотношений. Официальный оппонент д.б.н., проф. И.В. Максимов является ведущим специалистом в области фитоиммунитета, к.б.н. В.В. Емельянов является авторитетным исследователем физиологии стресса растений.

**На автореферат поступили отзывы (все отзывы положительные):**

1. к.б.н., С.А. Аленькина, ИБФРМ РАН, г. Саратов; 2. д.б.н., проф. Л.Г. Яруллина, БашГУ, г. Уфа; 3. к.б.н., доцент А.А. Овчаренко, ФГБОУ ВО СГУ им. Н.Г. Чернышевского, г. Саратов; 4. к.б.н., доцент А.В. Третьякова, ФГБОУ ВО ИГУ, г. Иркутск; 5. д.б.н., профессор И.Г. Тараканов и к.б.н., доцент Ю.С. Ларилова, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва; 6. д.б.н., профессор Н.Е. Павловская, ФГБОУ ВО ОГАУ им. Н.В. Парахина, г. Орел («Как влияет экзогенное вмешательство пероксида водорода на активность пероксидазы гороха и является ли повышение этой активности на проявление иммунитета гороха к патогенезу. Или эта реакция является независимой от патогенеза или мутуализма?», «Не совсем ясно, как можно использовать в биотехнологии результаты диссертации для разработки методов диагностики устойчивости и эффективности азотфиксации растений при данных, полученных на полумодельных опытах, так как при дальнейшем развитии растений эти различия могут полностью исчезнуть»).

Соискатель имеет 7 научных работ, из них 4 статьи в рецензируемых журналах из перечня ВАК РФ, из них 3 включены в международную базу цитирования Scopus.

**Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:**

1. Ломоватская Л. А. Активность аденилатциклаза и изменение концентрации цАМФ в клетках корня проростков гороха при инфицировании мутуалистами и фитопатогенами/ Л. А. Ломоватская, О. В. Кузакова, А. С. Романенко, **А. М. Гончарова** // Физиология растений. – 2018. – Т. 65, №. 4. – С. 310-320. doi: 10.7868/S0015330318040073.
2. Кузакова О. В. Влияние различных по симбиотической эффективности штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* на изменение концентрации цАМФ и пероксида водорода в клетках проростков гороха / О. В. Кузакова, Л. А. Ломоватская, **А. М. Гончарова**, А. С. Романенко // Физиология растений. – 2019. – Т. 66, №. 5. – С. 360-366. doi: 10.1134/S0015330319050129.
3. Ломоватская Л. А. цАМФ участвует в регуляции уровня пероксида водорода в корне проростков гороха при биотическом стрессе/ Л. А. Ломоватская, О. В. Кузакова, **А. М. Гончарова**, А. С. Романенко // Физиология растений. – 2020. – Т. 67, №. 3. – С. 270-277. doi: 10.31857/S0015330320020104.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:**

**разработаны** положения, вносящие значительный вклад в современное представление о взаимосвязи внутриклеточного сигналинга растений с процессами специфического/неспецифического узнавания на ранних этапах растительно-бактериального молекулярного диалога;

**предложена** схема активации аденилатциклазной и супероксидсинтазной сигнальных систем в клетках корня проростков гороха на ранних стадиях взаимодействия с *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *P. syringae* pv. *pisi* и *C. sepedonicus*.

**Теоретическая значимость исследований обоснована тем, что:**

**показана** взаимосвязь аденилатциклазной сигнальной системы с уровнем пероксида водорода в различных по степени сформированности волосков участках корней проростков гороха, в том числе на фоне кратковременного воздействия бактериальным мутуалистом и различными по специфичности к растению патогенов.

**Применительно к проблематике диссертации с получением обладающих новизной результатов использован** комплекс современных подходов и методов исследования, включающих микроскопические, биохимические анализы, микробиологические методы, иммуноферментный анализ и др; **впервые** показано, что бактериальная адгезия на различных по степени сформированности волосков участках корней проростков гороха, определяется специфичностью бактерий (*Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Clavibacter sepedonicus*) в отношении растения-хозяина. При этом активация компонентов АСС в участках корней проростков гороха под воздействием этих бактерий не зависит от интенсивности их адгезии. **Впервые** показано влияние экзогенного цАМФ на изменения концентрации  $H_2O_2$  в корнях проростков гороха. При искусственном снижении уровня цАМФ в корнях инокулированных бактериями проростков гороха, концентрация  $H_2O_2$  возросла. В то время как кратковременная инокуляция бактериальным мутуалистом или патогенами снижала уровень  $H_2O_2$  во всех участках корней. В экспериментах с применением экзогенного  $H_2O_2$  **впервые** установлено, что избыток этой молекулы способен снижать активности как трансмембранной, так и «растворимой» аденилатциклазы в гомогенате корней проростков гороха, особенно интенсивно после предварительного воздействия *Rlv*, *Psp* или *Cs*. По результатам проведенных исследований с привлечением литературных данных **предложена** схема взаимодействия аденилатциклазной и супероксидсинтазной сигнальных систем клеток корней гороха при воздействии азотфиксирующих и фитопатогенных бактерий.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

**получены** данные, которые могут использоваться в биотехнологии для разработки методов диагностики устойчивости и эффективности азотфиксации новых сортов растений и штаммов микроорганизмов путем создания тест-систем для определения эффективных бобово-ризобиальных симбиозов между определенными сортами бобовых и штаммами ризобий;

**представлены** материалы, которые могут быть включены в курсы лекций по физиологии и биохимии растений, микробиологии, экологии, а также использоваться в профильных научно-исследовательских институтах Российской академии наук.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила следующее:**

**для экспериментальных работ** результаты получены с применением оборудования Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН с использованием стандартных и апробированных методик. Заключение о достоверности результатов основано на статистической обработке экспериментальных данных;

**теория** основана на имеющихся в литературе данных о фитоиммунитете и сигнальных системах растений;

**использовано** сравнение авторских данных и данных, полученных другими исследователями по рассматриваемой тематике;

**установлены** общие закономерности взаимосвязи аденилатциклазной сигнальной системы с уровнем пероксида водорода в различных участках корней проростков гороха на фоне воздействия бактериальных патогенов и мутуалиста;

**использованы** современные методики сбора и обработки информации с использованием ресурсов Pubmed, eLIBRARY, Web of Science и др.

**Личный вклад соискателя состоит:** в планировании и проведении экспериментов, статистической обработке, обобщении и интерпретации полученных данных, в написании статей, опубликованных по результатам работы, а также в апробации результатов исследования в ходе выступления на конференциях различного уровня.

На заседании 17 марта 2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Гончаровой Алене Михайловне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 13 докторов наук, участвующих в заседании, из 19 человек входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту – 0 человек, проголосовали: за – 14, против – 1, недействительных бюллетеней – 0.

Председатель  
диссертационного совета  
Д 003. 047.01  
д.б.н., профессор

Войников Виктор Кириллович

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
Д 003. 047.01  
к.б.н.

Акимова Галина Петровна

18 марта 2022 г.

