

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Всероссийский научно-исследовательский институт  
сельскохозяйственной микробиологии»  
(ФГБНУ ВНИИСХМ)**

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,  
шоссе Подбельского, 3  
Телефон 8-812-470-51-00  
Факс 470-43-62

«Утверждаю»

Директор ФГБНУ ВНИИСХМ

*Н.А. Проворов* Проворов Н.А.

«1» марта 2022 г.

1.03.2022 № 59/03



**Отзыв ведущей организации**

на диссертацию Гончаровой Алены Михайловны «Влияние бактериальных патогенов и мутуалиста на активность компонентов аденилатциклазной сигнальной системы и ее взаимосвязь с уровнем пероксида водорода в проростках гороха»

Диссертация Гончаровой Алены Михайловны «Влияние бактериальных патогенов и мутуалиста на активность компонентов аденилатциклазной сигнальной системы и ее взаимосвязь с уровнем пероксида водорода в проростках гороха» посвящена исследованию важной проблемы регуляции сигнальных процессов у растений гороха на ранних стадиях формирования симбиоза с ризобиями, а также при развитии устойчивости к бактериальным патогенам.

На основании анализа активности трансмембранной (ТАЦ) и растворимой аденилатциклазы (РАЦ), оценки количества цАМФ в различных участках корня гороха при взаимодействии с бактериальными патогенами и мутуалистом, а также исследования влияния вторичного мессенджера цАМФ на продукцию активных форм кислорода, автор делает выводы о важной роли аденилатциклазы в контроле развития симбиоза у гороха, а также на ранних стадиях патогенеза.

**Актуальность исследования**

Актуальность исследования заключалась в необходимости изучения изменений в

активности компонентов аденилатциклазной сигнальной системы (трансмембранной и «растворимой» форм аденилатциклазы, уровня цАМФ) и концентрации  $H_2O_2$ , а также возможной взаимосвязи этих параметров в проростках гороха при взаимодействии с бактериальными патогенами и мутуалистом.

Полученные данные позволили сформировать современные представления о взаимосвязи внутриклеточных путей сигнальной трансдукции растений с процессами специфического или неспецифического узнавания партнеров на ранних этапах растительно-бактериального молекулярного диалога.

### **Научная новизна исследования и полученных результатов**

При выполнении своей диссертационной работы диссертанту удалось получить новые и принципиально важные результаты, многие из которых имеют приоритетный характер. В частности, было впервые показано, что бактериальная адгезия на различных участках корней проростков гороха, определяется специфичностью бактерий (*Rhizobium leguminosarum* bv *vicia*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Clavibacter sepedonicus*) в отношении растения-хозяина. Установлено при этом, что активация аденилатциклазы (АЦ) в определенных участках корней проростков гороха под воздействием этих бактерий не зависит от интенсивности их адгезии. Это подтверждается существенным возрастанием уровня цАМФ при инокуляции *Clavibacter sepedonicus*, несмотря на полное отсутствие адгезии данного патогена.

Было впервые доказано участие аденилатциклазы в процессах формирования бобово-ризобиального симбиоза, поскольку было выявлено значительное повышение активности аденилатциклазы и уровня цАМФ при инокуляции только эффективным по азотфиксации штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* в участках корня, наиболее восприимчивых к ризобиальной инфекции.

Впервые показано влияние экзогенного цАМФ на изменения концентрации  $H_2O_2$  в корнях проростков гороха. При снижении уровня цАМФ под влиянием ингибитора в корнях неинокулированных бактериями проростков гороха, концентрация  $H_2O_2$  возрастала. 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 *R. leguminosarum* bv *viciae*, *Pseudomonas*

*syringae* pv. *pisi* или *Clavibacter sepedonicus*.

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.

### **Практическая значимость работы.**

Результаты исследования могут быть использованы в биотехнологии для разработки методов диагностики устойчивости и эффективности азотфиксации у новых сортов растений и штаммов микроорганизмов.

Полученные данные могут быть использованы на практике для разработки рекомендаций по защите растений при воздействии бактериальных патогенов.

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

### **Содержание работы**

Основные материалы работы представлены в главах «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение» и «Заключение» и «Выводы». Следует отметить, что диссертантом проведен детальный анализ литературных данных, включающих большое количество публикаций (344 работы), что свидетельствует об эрудированности автора и его хорошей профессиональной подготовке. Обзор литературы оставляет хорошее впечатление в связи с использованием для анализа в том числе и данных статей последних лет 2020 – 2021.

Результаты представлены логично и последовательно. Первая часть работы посвящена сравнительному анализу данных об адгезии фитопатогенных и мутуалистических бактерий на различных участках корня гороха и стимуляции активности тАЦ и рАЦ, а также оценки уровня содержания цАМФ. В следующей части работы представлены результаты по изучению влияния H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и экзогенного цАМФ на растения гороха. Следует отметить достаточно большой объем проведенных исследований, а также качество представления материалов работы. Достоверность представленных результатов не вызывает сомнений на основании проведенного статистического анализа. Выводы работы отражают ее содержание и соответствуют поставленным задачам.

При оценке результатов работы и их обсуждения у рецензента возникли следующие вопросы и комментарии.

1. В разделах «Обзор литературы» и «Результаты и обсуждение» автор часто упоминает о лектинах, как о возможных рецепторах к Nod-факторам. Это утверждение неверно, поскольку рецепторами к этим сигнальным молекулам ризобий являются LysM-мотив содержащие рецептор-подобные киназы (LysM-РПК), что установлено на основании изучения мутантов растений, не восприимчивых к Nod-факторам, а также при непосредственном анализе связывания выявленных рецепторов с лигандом. Лектины рассматривались в качестве возможных рецепторов к Nod-факторам ранее, но в дальнейшем эта гипотеза не подтвердилась. Роль лектинов связывают с подавлением иммунного ответа у бобовых растений при узнавании симбионта.

2. Следует уточнить, что CERK1-подобный рецептор LYK9 у гороха является рецептором к хитину и хитоолигосахаридам с разной степенью полимеризации, при объединении с другими ко-рецепторами LYM1, LYM2 способен узнавать пептидогликан муреин. Автор правильно указывает на эту особенность. Однако возможность «узнавания» Nod-факторов этим рецептором имеет неспецифичный характер, из-за того, что остовом Nod-факторов являются хитоолигосахариды. По мнению рецензента следовало отметить данную особенность в «Обзоре литературы» и при обсуждении результатов.

3. К разделу «Материалы и методы исследований» у рецензента нет существенных замечаний. В качестве пожелания было бы полезным добавить описание того, как непосредственно проводили обработку бактериями и экзогенными веществами проростков гороха (объемы добавляемых суспензий в случае обработки на чашках или детали обработки в других условиях).

4. В разделе «Результаты и обсуждение» автор указывает на значительную активацию тАЦ и рАЦ под влиянием неспецифичного для гороха бактериального патогена *Clavibacter sepedonicus* на сроке 5 и 15 минут после инокуляции, связывая это, главным образом, с выделением экзополисахаридов, влияющих на изменение рН внеклеточной среды. При этом автор предполагает, что восприятие патогена происходит без участия рецепторов (стр. 67). Следует отметить, что активация неспецифического иммунитета (РТИ) у растений не предполагает избирательности по отношению к микроорганизмам и связана с узнаванием определенных поверхностных структур или секретлируемых в среду молекул с помощью паттерн-распознающих рецепторов для

любых микроорганизмов. Для данного патогена, прежде всего, выделяемых экзополисахаридов. Вероятно, следовало бы отметить в обсуждении результатов данного эксперимента, что активация тАЦ и рАЦ может быть связана как раз с развитием сильного иммунного ответа при взаимодействии этого патогена с растениями гороха на ранних стадиях. Для специфичного патогена *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* сильный иммунный ответ может не развиваться из-за выделения эффекторов.

5. На рисунке 16 не представлены результаты статистического анализа.
6. При обсуждении результатов 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. В качестве небольшого замечания следует отметить необходимость несколько структурировать текст при обсуждении результатов, что вероятно связано с большой увлеченностью автора полученными результатами.

Однако все представленные замечания и комментарии не влияют на общую положительную оценку работы рецензентом. Все материалы работы опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК.

### **Заключение**

Диссертационная работа Гончаровой Алены Михайловны является цельным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне. Следует отметить большой объем и трудоемкость проделанной работы. Основные результаты были получены впервые и не были известны ранее. Полученные диссертантом результаты достоверны, выводы обоснованы, соответствуют поставленным задачам и отражают суть проведенных исследований. Результаты изложены в печатных работах диссертанта, опубликованных в российских и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК РФ. Автореферат и опубликованные работы соответствует содержанию диссертации. Материалы диссертационной работы неоднократно докладывались на научных конференциях.

Таким образом, диссертация Гончаровой Алены Михайловны «Влияние бактериальных патогенов и мутуалиста на активность компонентов аденилатциклязной сигнальной системы и ее взаимосвязь с уровнем пероксида водорода в проростках гороха» посвящена важной и актуальной проблеме, является законченным исследованием,

выполнена на высоком научном и методическом уровне, соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по действующему «Положению о порядке присуждения ученых степеней» и профилю Диссертационного совета Д 003.047.01 при Сибирском институте физиологии и биохимии растений СО РАН, 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

Отзыв подготовлен доктором биологических наук, заведующей лабораторией сигнальной регуляции Федерального государственного бюджетного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии

Долгих Еленой Анатольевной



Тел.: 8(812)476-24-96; эл. почта: [dol2helen@yahoo.com](mailto:dol2helen@yahoo.com)

**Сведения о ведущей организации:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии (ФГБНУ ВНИИСХМ)

Адрес: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского 3

Тел.: 8(812)470-51-00; эл. почта: [arriam2008@yandex.ru](mailto:arriam2008@yandex.ru)