

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Даминовой Амины Галеевны «Формирование растительно-микробной патосистемы *Nicotiana tabacum* – *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043: ультраструктурный и физиологический аспекты», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.05 – физиология и биохимия растений и 03.02.03 – микробиология.

Актуальность исследования. Защита растений от бактериальных болезней является одной из важнейших задач современной фитопатологии и микробиологии. Многие эрвиниозы относятся к опасным и особо опасным заболеваниям плодовых, зерновых и декоративных культур. Объектом исследования представленной диссертационной работы послужил фитопатогенный микроорганизм *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora*), возбудитель черной ножки картофеля и мягких гнилей многих растений. Данный фитопатоген может быть причиной гибели 30 % урожая корнеплодов. Мягкие гнили вызывают значительные потери овощей и фруктов при хранении и транспортировке. Инфицированная продукция теряет качество и представляет опасность как источник распространения кишечных заболеваний человека. Таким образом, работа Даминовой А.Г. посвящена актуальной теме, имеющей высокую практическую значимость.

Научная новизна исследования. В природе патогенез не является преобладающим способом растительно-микробного взаимодействия и уступает по распространенности симбиотическим взаимоотношениям. Способность растений и микроорганизмов к формированию устойчивых сообществ в их естественной среде обитания всегда привлекала пристальное внимание физиологов растений и микробиологов. В этой связи, результаты диссертационной работы представляют особый интерес, поскольку в ней показано, что даже пектобактерии, относящиеся к некротрофным патогенам, могут реализовать стратегию колонизации растения-хозяина, протекающую как длительная бессимптомная инфекция. Один из главных выводов заключается в том, что для развития заболевания существенным является наличие восприимчивого ответа растений, который инициируется жасмонатной сигнальной системой. Бессимптомная инфекция развивается в том случае, если в растениях преобладает салицилат-индуцируемый ответ. Выявлены и описаны отличающиеся по ультраструктуре формы бактерий, являющиеся результатом фенотипической диссоциации и обеспечивающие персистенцию и стадию покоя у микроорганизмов. Открыты и исследованы особые мультиклеточные структуры, названные бактериальными эмболами. Показана роль этих новых

структурированных микробных сообществ в формировании симптомов вилта, а также их особое значение для распространения бактерий, заселения ими подземных органов, что является необходимым для вертикальной передачи патогена у вегетативно размножающихся растений. Проведено описание своеобразного способа коллективной подвижности у *P. atrosepticum*, связанной с формированием колоколообразных скоплений бактерий. Приуроченность к поздним стадиям инфекции и характер распространения микроорганизмов указывают на то, что автором выявлена новая форма адаптации бактерий, способствующая заселению ризосферы в конце вегетативного периода и горизонтальной передаче патогена. Таким образом, рассмотрен весь жизненный цикл фитопатогенной бактерии, в котором патогенез рассматривается как кратковременная и необязательная стадия.

Изложенное характеризует диссертационную работу как цельное исследование, результаты которого составляют его несомненную научную новизну.

Общая оценка работы. Рецензируемая работа содержит обобщение результатов разносторонних исследований взаимоотношений фитопатогенных бактерий *P. atrosepticum* с растениями табака, являющимися для них неспецифичным хозяином. Кроме того, представлены результаты изучения способов адаптации данных микроорганизмов к условиям модельных экспериментов, имитирующим природные условия между периодами вегетации растений. Сформулированные в работе задачи соответствуют цели исследований, конкретны и логичны в последовательности решений.

Диссертационная работа по **структуре и объему** соответствует общепринятым стандартам. Она состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов исследования, Результатов и их обсуждения, Выводов и Списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 199 страницах машинописного текста, содержит 1 таблицу и 19 рисунков. Список литературы включает 419 работ российских и зарубежных авторов. Результаты исследования представлены в 9 публикациях диссертанта – в 14 сообщениях в форме тезисов международных и российских симпозиумов, съездов и конференций, в 2-х статьях в международных рецензируемых изданиях и 1-й статье в российском журнале. Все издания соответствуют профилю диссертации и входят в Перечень ВАК РФ.

Во **Введении** диссертантом обоснованы актуальность, научная новизна, практическая значимость и основная цель исследования, заключающаяся в изучении морфологических и физиологических параметров клеток бактерий и растений в процессе формирования растительно-микробной патологической системы, включающей табак (*Nicotiana tabacum*) и *P. atrosepticum* SCRI1043, отражающих генетическую и физиологическую совместимость растений и бактерий.

Обзор литературы представлен в виде одной главы, в которой можно выделить четыре основных раздела – 1) общая характеристика растительно-микробных взаимодействий, 2) обсуждение роли систем гормональной регуляции растений в становлении растительно-микробных взаимодействий, 3) описание сведений о гетерогенности популяций бактерий, и 4) систематизация данных о взаимодействии пектобактерий и растений. Следует отметить, что обзор литературы заканчивается обобщающей частью, которая органично связывает накопленные знания с целью и задачами исследования.

В целом обзор литературы полно отражает состояние проблемы и содержит большое количество данных исследований последних лет (2000–2014 г.г.). Можно отметить значительный объем литературных источников, проанализированных диссертантом, что позволило дать подробное представление о предмете исследования. Список цитируемой литературы включает публикации как по фундаментальным исследованиям, так и практическим работам по тематике диссертационной работы. Диссертант демонстрирует хорошее знание современного состояния исследований по тематике диссертации, способность к квалифицированному обсуждению и анализу имеющихся данных, обоснованию задач исследования и планированию эксперимента. Представленные в литературном обзоре данные, в том числе работы последних лет, убедительно обосновывают востребованность проведенного в диссертационной работе исследования. Представленный в обзоре литературы большой объем информации может быть использован как справочное пособие, суммирующее современные сведения по данной проблеме.

В главе **«Материалы и методы»** представлен большой набор современных методов микробиологии, физиологии, микроскопии, биохимии и молекулярной биологии. Выбор методов адекватно соответствует основным задачам исследования. Подробное изложение методик позволяет в полной мере анализировать и воспроизводить результаты, полученные автором. Применение современных методов исследования, их соответствие поставленной цели и задачам свидетельствует о высокой квалификации диссертанта, позволяет рассматривать научные положения, выводы и практические рекомендации автора как достоверные, на уровне установленных фактов.

Глава **«Результаты и обсуждение»** содержит полученные экспериментальные данные, их описание и анализ в контексте современного уровня знаний по рассматриваемой проблеме. Результаты работы отвечают необходимым критериям научной новизны, имеют большое теоретическое и практическое значение.

На основании экспериментальных данных автором впервые описан процесс диссоциации популяции фитопатогенных бактерий в организме растения-хозяина; выявлены фенотипы бактерий, ассоциированные с бактериальными эмболами, осуществляющие коллективную подвижность, колонизирующие паренхиму, адаптированные к состоянию покоя; показано, что образование специализированных морфотипов происходит тканеспецифично и/или на определенной стадии патогенеза. Впервые описаны изменения в ультраструктуре клеток и тканей растений табака при развитии заболевания, вызванного бактериями рода *Pectobacterium*: набухание клеточных органелл и компартментов (хлоропласты, ЭПР), инвагинация и везикуляризация плазмалеммы, модификация структуры клеточной стенки, образование осмиофильных глобул в вакуолях. Показано, что при типичных и при бессимптомных инфекциях, вызванных *P. atrosepticum* SCRI1043, активируются разные защитные системы растения-хозяина. Выявлено, что при типичных инфекциях, сопряженных с развитием симптомов заболевания, активируется жасмонат-зависимый ответ, но не салицилат-зависимый, в то время как при бессимптомных инфекциях, наоборот, жасмонат-зависимый ответ не активируется, а экспрессия салицилат-индуцируемого маркерного гена PR-1 возрастает.

Представленные данные проиллюстрированы рисунками и микрографиями, выполненными с высоким качеством, снабженными детальными подписями и исчерпывающими пояснениями.

В главе «**Заключение**» диссертантом проведено обобщение полученных результатов, на основании чего сформулирована новая гипотеза патогенеза при эрвиниозах растений, основанная на представлении о системной устойчивой инфекции. Предложена оригинальная схема жизненного цикла *P. atrosepticum*, включающего чередование стадий колонизации, восходящей и нисходящей миграции по проводящей системе растения, связанных с построением бактериальных эмболов, вертикальной и горизонтальной трансдукции патогенна; в завершение жизненного цикла наступает стадия покоя, связанная с переходом клеток в некультивируемое состояние. Сделано интересное предположение, что инициация нового жизненного цикла стимулируется чередованием замораживания и оттаивания клеток микроорганизмов перед началом нового вегетативного периода. Представленная гипотеза вносит вклад в изучение растительно-микробных взаимодействий и может послужить теоретической основой предстоящих исследований.

В заключение экспериментальной части представлены **выводы**, которые логично опираются на фактический материал, сформулированы лаконично и последовательно. В целом материалы диссертации свидетельствуют об успешном

решении задач исследования и получении новых научных данных, имеющих как фундаментальное, так и прикладное значение.

По диссертации имеются следующие вопросы и замечания. В обширном обзоре литературы недостаточное место занимают российские авторы. В частности, при рассмотрении бобово-ризобиального симбиоза не упоминается монография Н.А. Проворова и Н.И. Воробьева, вышедшая в 2012 году. Мало внимания уделено рассмотрению состава и строения клеточной стенки растений, хотя исследование роли полимеров растительного происхождения в построении бактериальных эмболов составляет значительную часть экспериментальной работы. Признавая правомерность сделанных автором выводов для данной патосистемы, основанной на взаимодействии *P. atrosepticum* с табаком, как с неспецифичным хозяином, представляется интересным сравнение полученных результатов с данными, имеющимися в отношении специфичного хозяина, которым для данного фитопатогена является картофель. В работе не приведены данные о проверке модельных объектов на возможную контаминацию. Вероятность такой контаминации растений, например, эндофитами в подобных исследованиях существует. Идентификацию фенольных соединений, вырабатываемых растениями и, возможно, участвующих в построении матрикса бактериальных эмболов, нельзя признать окончательной. В частности, для достоверной идентификации феруловой кислоты данных хроматографии, без масс-спектрометрического анализа, не достаточно. При рассмотрении строения бактериальных эмболов автор описывает весьма интересные поверхностные образования, названные «пилеподобные структуры». Делается предположение, что функция этих образований связана с обменом соседними клетками метаболитами – белками, нуклеиновыми кислотами, сигнальными соединениями. В тоже время, на представленных электронных микрографиях данные структуры имеют больше сходства с пилями первого типа, как правило, отвечающими за прикрепление бактерий.

В целом, следует отметить, что высказанные замечания никоим образом не влияют на общую высокую ценность представленной к защите диссертации и на ее результаты и выводы.

В заключение можно сделать вывод, что диссертация Даминовой А.Г. является цельной, завершенной работой, изложена доступно, ясным научным языком, хорошо оформлена. Работа выполнена на самом высоком теоретическом и экспериментальных уровнях. Использование самых современных и разнообразных методов исследования позволяют утверждать о высокой надежности и достоверности полученных данных. Название работы полностью соответствует ее содержанию. Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах

собственных исследований автора. При использовании данных, полученных в соавторстве, приведены необходимые ссылки. По результатам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК России для публикаций основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук. Результаты диссертации прошли апробацию на представительных научных мероприятиях, соответствующих профилю работы. Публикации автора отражают полученные им экспериментальные данные. Автореферат соответствует содержанию диссертации и с необходимой полнотой отражает ее результаты.

Таким образом, представленная диссертационная работа Даминовой Амины Галеевны «Формирование растительно-микробной патосистемы *Nicotiana tabacum* – *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043: ультраструктурный и физиологический аспекты», является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований содержится решение новой актуальной научной задачи в области изучения растительно-микробного взаимодействия. По объему, актуальности, научной новизне, целостности, законченности, практической значимости и публикациям диссертационная работа полностью соответствует критериям кандидатской диссертации, изложенным в Разделе II «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор – Даминова Амина Галеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.05 – Физиология и биохимия растений и 03.02.03 – Микробиология.

Доктор биологических наук
заведующий лабораторией ризосферной микрофлоры
Государственного научного учреждения
Всероссийского научно-исследовательского института
сельскохозяйственной микробиологии
Российской академии сельскохозяйственных наук

Белимов А.А.

30 ноября 2014 г.

Подпись Белимова А.А. верна
Ученый секретарь, канд. биол. наук,
Алисова С.М.

