

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор –
начальник Управления научной политики
и организации научных исследований

МГУ имени М.В.Ломоносова
А.А.Федянин

«26» ноября 2014 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова" о теоретической и практической ценности диссертации Даминовой Амины Галеевны «Формирование растительно-микробной патосистемы *Nicotiana tabacum* – *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043: ультраструктурный и физиологический аспекты», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.05 – физиология и биохимия растений и 03.02.03 – микробиология.

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа Даминовой Амины Галеевны посвящена исследованию процесса формирования растительно-микробной патосистемы *Nicotiana tabacum* – *Pectobacterium atrosepticum* (в прежней классификации *Erwinia carotovora*). Расшифровка механизмов взаимодействия многоклеточных организмов с прокариотами является одной из важнейших проблем современной биологии. Способность растений и микроорганизмов к формированию интегрированных систем находится в фокусе внимания как физиологов растений, так и микробиологов. Это явление, несомненно, занимает значительное место среди проблем фундаментальных исследований, а также имеет большое значение в связи с агротехнологическими аспектами. При этом особое внимание отводится исследованию патогенного потенциала микроорганизмов и механизмов его регуляции, а также вопросам, касающимся индукции фитоиммунитета. В то же время практически не исследованными остаются события, происходящие в инфицированных растениях в рамках физиологического объединения элементов патосистемы. Такое объединение, позволяющее партнерам длительно выживать в пределах онтогенеза макроорганизма, или на протяжении многих поколений, сопряжено с реализацией особых физиологических программ обоих партнеров, что формирует основу для совместимости патогена и хозяина. При этом взаимодействие в системе паразит-хозяин может осуществляться по альтернативным сценариям, которые могут определять тип взаимодействия, развитие и исход инфекционного процесса. Исследование этих вопросов и составляет фундаментальную основу задачи, решаемой в рамках рецензируемой работы, актуальность которой не вызывает сомнения.

Структура и объем диссертации

Диссертация представляет собой целостное, законченное исследование. Она состоит из введения, главы, посвященной обзору научной литературы по теме исследования, главы, в которой проведено подробное описание использованных материалов и методов, главы «Результаты и их обсуждение», заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 199 страницах машинописного текста. В работе представлена 1 таблица и 19 рисунков. Список литературы включает 419 источников, в том числе, 385 – иностранных.

Научная новизна исследования

В работе получены новые сведения о диссоциации популяции микроорганизмов в растении-хозяине, при которой в разных тканях макроорганизма и/или на разных стадиях инфекционного процесса формируются дифференцированные клеточные фенотипы бактерий, различающиеся по ультраструктурным характеристикам. Особую значимость представляют данные о впервые описанных бактериальных эмболах, формирующихся в сосудах ксилемы инфицированных растений. Автором показано, что данные структуры образуются при участии обоих партнеров – патогена и хозяина. Выявлена ключевая роль бактериальных эмболов в формировании и функционировании патосистемы.

Несомненную новизну также представляет выяснение ультраструктурных и физиологических критериев, характеризующих различные взаимодействия микро- и макроорганизмов – типичные и бессимптомные инфекции – в исследуемой системе паразит-хозяин.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Полученные автором данные расширяют представление о растительно-микробном взаимодействии. Показано, что стратегия даже таких агрессивных патогенов как пектобактерии не ограничивается «грубой силой», но может осуществляться и с применением тонких механизмов длительного сосуществования. В этом заключается теоретическая новизна исследования. Следует отметить и практическую значимость полученных результатов. Представленные данные могут служить основой для создания новых способов контроля бактериозов растений, в том числе, вызываемых пектобактериями – одними из наиболее вредоносных фитопатогенов в мире.

Общая характеристика диссертации

Во **введении** раскрыта актуальность темы исследования. Автор указывает на важную роль не только генетической, но и физиологической совместимости растений и бактерий в формировании патологических систем. Эта совместимость (или несовместимость) является результатом сложного «диалога» макро- и микроорганизмов, в котором принимает участие множество регуляторных систем и реализуются различные адаптивные программы. Однако критерии физиологической совместимости остаются на сегодняшний день практически неисследованными, что в особенности справедливо для микроорганизмов, вызывающих «мягкие гнили» растений. В этом разделе сформулированы цели, задачи и основные положения, отражающие научную новизну работы, а также определена ее научно-практическая значимость.

«**Обзор литературы**» (стр. 14-66) построен логично и хорошо написан. В нем оригинально и полно систематизирована обширная и современная

информация, касающаяся тематики диссертационного исследования, а именно растительно-микробных взаимодействий, роли систем гормональной регуляции растений в формировании взаимоотношений между растениями и микроорганизмами, гетерогенности популяций бактерий, а также подробно описаны известные механизмы взаимодействия пектобактерий и растений. В заключительной части обзора литературы автор проводит обобщение приведенных сведений, акцентирует внимание на тех моментах, которые недостаточно изучены и которые были определены в качестве предмета исследования. В целом анализ литературы хорошо аргументирует цель рецензируемой работы и позволяет дать сравнительную оценку результатов, полученных автором, определить их место в русле работ по тематике растительно-микробных взаимоотношений. К этой главе имеется небольшое замечание. Учитывая то, что большая часть экспериментального раздела посвящена исследованию модификации в ходе инфекционного процесса партнеров патосистемы и, прежде всего их клеточных стенок, включая пектиновые и пептидогликановые компоненты, этому аспекту следовало бы посветить отдельную часть обзора литературы, вероятно, за счет несколько излишне пространного повествования в других разделах обзора. Кроме того, в подразделе, посвященном L-формам (стр. 30) автор пишет: «У грамотрицательных бактерий существуют особые клеточные формы, названные L-формами». Допущенная неточность формулировки создает ложное представление об ограничении этого адаптационного свойства кругом только грамотрицательных прокариот, в то время как L-трансформация, или L-фаза, широко распространенное явление и у грамположительных бактерий.

Глава «**Материалы и методы исследования**» (стр. 67-86) содержит детальное описание всех использованных в работе методов исследований, а также обосновывается выбор модельной системы. Набор органично комбинируемых классических и современных методов микроскопии, биохимии, молекулярной биологии и микробиологии соответствует современному мировому уровню, что позволило автору провести комплексное исследование для адекватного решения поставленных задач.

Глава (стр. 87-141), посвященная описанию **результатов исследования и их обсуждению** содержит пять разделов. Первый из них посвящен описанию использованной модельной патосистемы: охарактеризована симптоматика и динамика титра клеток патогена в растении-хозяине. Благодаря использованию количественного ПЦР-анализа наряду с микробиологическими посевами автору удалось выявить на остатках инфицированных растений формы исследуемого патогена, утратившие в условиях эксперимента способность к колониеобразованию, т.е. формы, не демонстрирующие этого свойства в течение двухсуточной инкубации. Подобраны условия (цикл замораживания-оттаивания), обеспечивающие взрывное (в течение первых двух часов после оттаивания) восстановление колониеобразующей способности таких клеток с сохранением вирулентности пролиферирующих бактерий. На основании представленных результатов диссертант делает заключение, «что завершение популяционного цикла *Pba* в организме растения сопряжено с переходом бактериальных клеток в жизнеспособное, но некультивируемое состояние» (страница 91, первое предложение последнего абзаца). Однако выше справедливо указано, что переход

в жизнеспособное, но некультивируемое состояние связан (кроме прочего) с утолщением клеточной стенки, уплотнением пептидогликанового слоя и терминацией процесса репликации (см. обзор литературы стр. 25). Судя по приведенным в работе электронным микрофотографиям, клеточная стенка бактерий напротив скорее подвержена редукции: продемонстрировано нарушение ригидности клеточной стенки, увеличение периплазматического пространства и его явное «просветление», что может указывать на частичный или полный гидролиз пептидогликана. Обнаружение высокого титра геномных копий при отсутствии колониеобразования говорит о том, что бактерии находятся вне состояния активной пролиферации, т.е. в состоянии покоя, но в какой форме судить невозможно. Так, например, L-формы чаще всего формируют видимые колонии при инкубации не менее 10-14 суток, а в работе подсчет колоний проводили через 2-е суток. Взрывное восстановление колониеобразования при «оживлении» может объясняться поликопийным геномом L-форм, и их размножением множественными элементарными телами, ревертирующими в нормальные клетки.

Поскольку одной из основных задач настоящего исследования была попытка выявления гетерогенности в популяциях пектобактерий в организме хозяина, второй раздел главы посвящен оценке способности клеток *Pectobacterium atrosepticum* к формированию разнородных морфотипов. Следует отметить, что автором выбраны адекватные модельные системы *in vitro*, с помощью которых эта способность была подтверждена. К сожалению, описывая ультраструктурную модификацию и отмечая увеличение и даже набухание периплазмы, автор не приводит никакой информации о состоянии муреинового слоя клеточной стенки, а использованные на электроннограммах увеличения не позволяют читателю самостоятельно судить о сохранности пептидогликана, и возможном переходе клеток в сферопластный морфотип. Как следствие, нельзя исключить и в этом случае фазы несбалансированного роста и образования L-форм, хотя для *Erwinia carotovora* var. *atroseptica in vitro* and *in vivo* описана L-фаза (Jones, Paton, 1973).

В третьем разделе приведены экспериментальные данные электронной микроскопии, которые описывают динамику событий, происходящих внутри инфицированных растений. Автором установлено, что при колонизации растений в популяциях бактерий происходит образование разных клеточных фенотипов, которые приурочены к той или иной стадии взаимодействия или типу ткани хозяина. Особую важность представляет выявление новых структур — бактериальных эмболов, которые блокируют сосуды ксилемы и способствуют нисходящей миграции бактерий к подземным органам растений. В данном разделе также проведена характеристика бессимптомной инфекции в исследуемой патологической системе и выявлены особенности локализации патогена при этом типе взаимодействия.

В четвертом разделе главы автор устанавливает физиологические различия между типичной и бессимптомной инфекцией, которые связаны с дифференциальной работой гормональных систем, опосредуемых салициловой и жасмоновой кислотами. К сожалению, при описании результатов автор не обсуждает возможную причину дифференциального развития инфекционного процесса в исследуемой патосистеме, что было бы уместным в данном контексте.

Заключительный раздел главы «результаты исследования и их обсуждение» посвящен описанию принципов формирования бактериальных эмболов. На основании данных электронной микроскопии выдвигается предположение, что процесс образования этих структур может быть связан с модификацией углеводов растительной клеточной стенки, что в дальнейшем диссертант подтверждает с применением биохимических и иммуноцитохимических подходов. По результатам этих исследований автор приводит интересную схему процесса формирования матрикса бактериальных эмболов из продуктов разложения полисахаридов растительной клеточной стенки. Однако нельзя не отметить, что эта схема носит на данном этапе гипотетический характер. Автор предполагает, что фрагменты рамногалактуронана I сшиваются в трехмерную молекулярную сеть с участием фенольных соединений. Подтверждение данного предположения требует идентификации данных соединений и доказательства их образования именно в ксилемных сосудах.

За изложением результатов исследований и их обсуждением следует «**Заключение**», в котором основные положения диссертации суммированы в оригинальной схеме. Завершают работу **выводы**, которые соответствуют поставленным цели и задачам исследования и в полной мере отражают полученные автором результаты.

Оценивая работу в целом, можно констатировать, что она представляет собой оригинальное законченное научно-квалификационное исследование, в котором поставленная цель актуальна, существующая литература проанализирована с достаточной полнотой и глубиной, использованные подходы и методы адекватны и современны, результаты представляют научную ценность, выводы соответствуют поставленным задачам. Результаты работы опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК, в том числе в престижных зарубежных изданиях, а также апробированы на многочисленных отечественных и международных конференциях. Автореферат в достаточной степени отражает содержание работы.

Результаты диссертации могут быть использованы для внедрения, продолжения и развития подобных исследований как в Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН, так и в Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническом институте им. В.Л. Комарова РАН, Институте микробиологии им. Виноградского РАН, Всероссийском институте защиты растений, Всероссийском научно-исследовательском институте фитопатологии, Всероссийском институте растениеводства им. Н.И. Вавилова и других биологических и сельскохозяйственных институтах. Они могут быть также использованы в учебном процессе при чтении курсов лекций по физиологии и биохимии растений, микробиологии, симбиологии и фитопатологии.

Таким образом, диссертационная работа «Формирование растительно-микробной патосистемы *Nicotiana tabacum* – *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 ультраструктурный и физиологический аспекты» по теоретическому уровню, объему приведенных исследований, научной новизне и практической значимости отвечает критериям, сформулированным в Разделе II «Положения о присуждении

ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., 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.

Диссертация и отзыв обсуждены на заседании кафедры биоинженерии биологического факультета Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова 25.11.2014, протокол № 19.

Ведущий научный сотрудник кафедры
биоинженерии биологического факультета МГУ
доктор биологических наук

 О.А. Горелова

Ученый секретарь кафедры
биоинженерии биологического факультета МГУ
доцент, кандидат биологических наук

 Н.В. Малюченко

Заместитель заведующего кафедрой
биоинженерии биологического факультета МГУ
профессор, доктор биологических наук

 Е.С. Лобакова


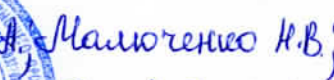

Сведения о ведущей организации:

1. Полное наименование: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»
2. Сокращенное наименование: Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, МГУ имени М.В.Ломоносова, или МГУ
3. Почтовый адрес: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1
4. Юридический адрес: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1
5. Телефон (495) 939-27-29, Email: info@rector.msu.ru

ПОДПИСЬ РУКИ
ЗАВЕРЯЮ

Документовед биологического факультета МГУ



 Гореловой О.А.;
 Малюченко Н.В.;
 Лобаковой Е.С.