

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Исламова Бахтияра Рамилевича «Роль экстраклеточных полисахаридов фитопатогенной бактерии *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 в формировании растительно-микробной патосистемы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.21 – Физиология и биохимия растений и 1.5.11 – Микробиология

Актуальность темы диссертации

Синтезируемые бактериями полисахариды характеризуются большим структурным и функциональным многообразием. Среди этих биополимеров следует отметить гликополимеры мембран, капсульные полисахариды, связанные с поверхностью клетки, экскретируемые в окружающую среду экзополисахариды, а также полисахаридные компоненты матрикса биопленок. Все многообразие биологических функций бактериальных полисахаридов, среди которых устойчивость к высыханию, защита от неспецифического и специфического иммунитета макроорганизма, антигенность, токсичность, связывание двухвалентных катионов металлов, специфичность взаимодействия с микро- и макроорганизмами и т.д., реализуется благодаря их разнообразному строению, обусловленному множеством моносахаридов, их комбинаций и типов связей в полимере, а также наличию неуглеводных заместителей.

Следует отметить, что для ряда фитопатогенных бактерий показано, что экстраклеточные гликополимеры могут являться факторами вирулентности, входить в состав матрикса биопленок, а также выступать в качестве элиситоров либо иммуносупрессоров при развитии патофизиологического процесса. При этом информация о структуре и функциях гликополимеров мембран одних из наиболее вредоносных фитопатогенных бактерий рода *Pectobacterium* ограничена, а сведения о экстраклеточных полисахаридах (ЭПС) отсутствуют. В то же время, в геноме этих бактерий выявлены гены, кодирующие ферменты биосинтеза ЭПС, показана индукция экспрессии этих генов в условиях *in planta*, продемонстрирована способность пектобактерий формировать в сосудах первичной ксилемы биопленко-подобные структуры – бактериальные эмболы с визуализируемым экстраклеточным матриксом, в биогенезе которого полимерная сеть, первоначально сформированная остатками рамногалактуронана I, постепенно замещается экстраклеточными полимерами бактерий.

В этой связи работа Б.Р. Исламова, посвященная идентификации экстраклеточного полисахарида фитопатогенных бактерий *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043, характеристике его структурных особенностей и биологической активности в процессе растительно-бактериального взаимодействия, является актуальной.

Достоверность и новизна результатов и выводов

Достоверность научных результатов и сформулированных на основании их анализа выводов не вызывает сомнения и определяется значительным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием широкого спектра микробиологических, физико-химических, биохимических, гистологических и микроскопических методов исследования. Для экспериментальной части работы характерно грамотное планирование, при котором каждый этап является логическим продолжением предыдущего. Для решения каждой задачи были подобраны адекватные методы, а полученные результаты были корректно статистически проанализированы.

При оценке новизны полученных результатов следует особо выделить следующие ключевые моменты:

1. Впервые для представителей р. *Pectobacterium* показана способность продуцировать ЭПС, подобраны условия культивирования (состав среды и продолжительность культивирования), стимулирующие продукцию экстраклеточных гликополимеров. Проведено выделение ЭПС, для которых охарактеризован фракционный состав, а для высокополимерной фракции определена структура разветвленного пентасахаридного повторяющегося звена. Охарактеризовано поведение ЭПС в водных растворах (вязкость, размер образуемых агрегатов).

2. Продемонстрировано присутствие ЭПС *P. atrosepticum* SCRI1043 в составе полимерного матрикса бактериальных эмболов, образуемых в сосудах первичной ксилемы при инфицировании растений пектобактериями. Показана роль ЭПС как матрикс-формирующего полимера в поддержании структурной целостности эмболов и защите бактерий от иммунных ответов растения-хозяина.

3. Получены приоритетные данные о фитоиммуносупрессорных свойствах (подавление индуцируемого патогеном накопления активных форм кислорода, предотвращение индукции каталазной активности в тканях растений), и антиоксидантной активности (детоксикация активных форм кислорода, повышение устойчивости клеток к действию окислителей) ЭПС *P. atrosepticum* SCRI1043.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Диссертационная работа Б.Р. Исламова представляет фундаментальное исследование экстраклеточных гликополимеров патогенных для растений бактерий *P. atrosepticum* SCRI1043. В ходе выполнения экспериментальной части исследования впервые была показана способность бактерий р. *Pectobacterium* продуцировать ЭПС, а также выявлены свойства этих метаболитов, которые определяют особенности бактериальной колонизации растения-хозяина. Результаты исследований могут быть востребованы при разработке новых способов контроля мягких гнилей, вызываемых пектобактериями. Проведенные эксперименты расширяют представление о

физиологической активности ЭПС бактерий, а именно детоксикации активных форм кислорода и защиты клеток от действия окислителей. Следует отметить, что материал диссертационной работы и собранные в ней методические приемы могут быть использованы в учебном процессе при чтении курсов лекций по фитопатологии, физиологии растений и микробиологии.

Содержание диссертации, ее завершенность, публикации автора в научной печати

Диссертация написана по традиционному плану. Она состоит из введения, обзора литературы и экспериментальной части, содержащей два основных раздела: материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, а также заключения, выводов и списка используемой литературы, включающего 322 литературных источника, в том числе 6 – на русском языке. Материалы диссертации изложены на 155 страницах и иллюстрированы 22 рисунками и 4 таблицами.

В обзоре литературы обобщены сведения о бактериях рода *Pectobacterium*, а именно симптоматике их взаимодействия с растениями, факторах вирулентности, стратегиях колонизации растений, а также физиологических основах устойчивости либо восприимчивости растений к пектобактериям. Во второй части литературного обзора автор детально освещает структурно-функциональные особенности экстраклеточных полисахаридов, продуцируемых бактериями.

Сведения, представленные в обзоре, грамотно изложены, систематизированы и критически осмыслены автором. Обзор литературы позволяет сделать заключение, что диссертант осведомлен о современном состоянии исследований в данной области науки в полной мере. Не остается сомнений в обоснованности и актуальности темы исследования.

Изложенный в главе 2 диссертации материал позволяет получить исчерпывающее представление о широком спектре методических подходов, используемых в экспериментальной части работы. Хотелось бы отметить, что диссертантом были освоены методы работы с микробиологическими культурами; методы выделения, фракционирования и анализа бактериальных гликополимеров, включая структурные методы анализа; методы культивирования растений, их инфицирования пектобактериями и иммунодетекции ЭПС с использованием микроскопии.

Результаты исследований изложены в семи разделах и последовательно описывают идентификацию, выделение, фракционирование и определение структуры повторяющегося звена ЭПС бактерий *P. atrosepticum* SCRI1043. Диссертанту удалось выделить ЭПС при культивировании пектобактерий в условиях дефицита источника углерода. ЭПС пектобактерий впервые был идентифицирован и выделен при непосредственном участии диссертанта.

С использованием одно- и двумерной ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии были получены приоритетные данные о структуре повторяющегося звена ЭПС *P. atrosepticum* SCRI1043, представленного трисахаридным

повторяющемся звеном основной цепи из остатков 3-замещенной α -D-Galp, 2,3-дизамещенной α -D-Manp и 4-замещенной α -L-Rhap и дисахаридным звеном боковой цепи из остатков терминальной эрвиниозы и 3-замещенной α -D-Galp, ацетилированной во втором положении. Структура ЭПС штамма *P. atrosepticum* SCRI1043 оказалась идентична установленной ранее структуре О-полисахарида из липополисахарида штамма *P. atrosepticum* GSPB 9205.

Для ЭПС исследуемого штамма были охарактеризованы физико-химические свойства водных растворов, а также антиоксидантные свойства.

Работу завершает заключение, в краткой форме обобщающее результаты проведенных исследований и резюмирующее их. Выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований автора, обоснованы и достоверны. Говоря о работе в целом, необходимо заключить, что она написана научным языком и хорошо оформлена. Рисунки и таблицы в достаточной мере иллюстрируют полученные автором результаты.

Замечания и вопросы

Существенных недостатков у оппонируемой работы не выявлено, а указанные ниже недочеты и замечания никоим образом не умаляют значимость предпринятых диссертантом усилий в получении результатов высокого научного уровня.

Следует отметить, что приведенный на стр. 5 список не содержит несколько сокращений и условных обозначений, приведенных в тексте, например АБК, ОРХ, РТФЕ, а в некоторых случаях введение сокращений в тексте приведено несколько раз, например, ЭПС, РГ-1. В тексте присутствуют некоторые погрешности оформления, выражающиеся в наличии опечаток, а также использовании лабораторных жаргонизмов, например, «мертвый объем колонки», «голодающие клетки». В оформлении рисунков и таблиц допущены некоторые отступления от требований ГОСТ. Рисунок 2 было бы целесообразно разделить на два: колонизация сосудов ксилемы и колонизация паренхимы, что позволило бы облегчить его восприятие. На рисунке 3 главы 1 приведена структура повторяющегося звена ЭПС *P. atrosepticum*, установленная диссертантом в ходе выполнения экспериментальной части работы. На мой взгляд, информацию о структуре полисахаридов растений (стр. 37) следовало бы выделить в отдельный раздел. В некоторых случаях допущены погрешности в оформлении ссылок на цитируемую литературу. Например, на стр. 39 во второй строчке приведена ссылка на работу Schmid et al., 2015, а ниже в подписи к рисунку 4 ссылка на ту же работу ...Schmid, 2015. На стр. 42 к образуемым при внеклеточном синтезе фруктанам, помимо указанного левана, следует добавить инулин. На стр. 57 в описании метода определения содержания углеводов указано, что реакционную смесь выдерживали 10 минут при комнатной температуре, а затем термостатировали 15 минут при 100 °С. В оригинальной методике Dubois et al., 1956 указаны условия термостатирования реакционной смеси при 25-30 °С. На стр. 87 при

описании результатов двумерного эксперимента ЯМР ROESY допущена неточность в его названии. Правильно – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат. В таблице 3 отсутствуют границы. Рисунок 18 содержит таблицу, которая содержит значительную часть информации, характеризующую размер частиц ЭПС. Логичнее было бы ее выведение из рисунка и оформление в соответствии с правилами оформления таблиц.

В ходе ознакомления с материалами диссертационной работы возник ряд **вопросов**:

1. Какой объем бактериальной культуры *P. atrosepticum* был получен для выделения препаративных количеств ЭПС, достаточных для дальнейших исследований структуры и функций полимера?

2. Почему была выбрана среда без источника углерода для культивирования *P. atrosepticum* с целью получения ЭПС? В литературном обзоре приведен ряд методических подходов с целью индукции биосинтеза ЭПС, например, использование питательных сред со сниженным содержанием источника азота и избытком источника углерода. Для увеличения продукции ЭПС в ряде случаев подбирают источник углерода, либо варьируют температуру культивирования и/или продолжительность роста бактериальной культуры.

3. В работе была установлена структура повторяющегося звена ЭПС штамма *P. atrosepticum* SCRI1043, которая была идентична установленной ранее структуре О-полисахарида (ОПС) штамма *P. atrosepticum* GSPB 9205, установленной Сенченковой с соавт. Учитывая схожесть, а в ряде случаев идентичность механизма биосинтеза ЭПС и ОПС, что известно о структуре ОПС исследуемого в работе штамма *P. atrosepticum* SCRI1043?

4. Для ЛПС и ЭПС штамма *P. atrosepticum* SCRI1043 показаны различия в электрофоретической подвижности, а также в содержании 3-дезоксид-D-манно-2-октулозоновой кислоты. Насколько эти полимеры отличались антигенно? Исключается ли вероятность нахождения в матриксе бактериальных эмболов липополисахаридов?

Опубликованные результаты диссертации в научной печати

По материалам диссертационной работы в научной печати опубликовано 11 работ, в том числе две статьи в журналах Q1, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в базе данных Web of Science.

Содержание автореферата

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в достаточной мере отражает основные положения диссертации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Исламова Бахтияра Рамилевича, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук,

по объему и научно-методическому уровню выполненных исследований является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержатся приоритетные данные о структурных особенностях, физико-химических свойствах и биологической активности экзополисахаридов фитопатогенных бактерий *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043. По актуальности тематики, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и полноте их изложения, обоснованности выводов диссертационная работа соответствует специальностям 1.5.21 – Физиология и биохимия растений и 1.5.11 – Микробиология, в полной мере удовлетворяет требованиям раздела II «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. «О порядке присуждения ученых степеней» (в редакции Постановления Правительства РФ от 11.09.2021 г. № 1539), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Исламов Бахтияр Рамилевич – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Официальный оппонент

кандидат биологических наук, доцент

заведующий лабораторией биохимии

Института биохимии и физиологии

растений и микроорганизмов –

обособленного структурного подразделения

Федерального государственного бюджетного

учреждения науки Федерального исследовательского центра

«Саратовский научный центр Российской академии наук»

410049 г. Саратов, пр-т Энтузиастов, д. 13

+7(8452)970444; fedonenko_yu@ibppm.ru

Федоненко Юлия Петровна

Личную подпись Юлии Петровны Федоненко заверяю

ученый секретарь Института биохимии и физиологии

растений и микроорганизмов –

обособленного структурного подразделения

Федерального государственного бюджетного

учреждения науки Федерального исследовательского центра

«Саратовский научный центр Российской академии наук»

кандидат биологических наук

Института биохимии и физиологии

растений и микроорганизмов –

обособленного структурного подразделения

Федерального государственного бюджетного

учреждения науки Федерального исследовательского центра

«Саратовский научный центр Российской академии наук»

О.Г. Селиванова

2 декабря 2021 г.

