

ОТЗЫВ

на диссертационную работу Омеличкиной Юлии Викторовны «Ответные реакции растений на действие фитопатогена *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 физиология и биохимия растений.

Диссертационная работа Омеличкиной Юлии Викторовны посвящена выяснению физиолого-биохимических критериев формирования совместимых и несовместимых растительно-микробных патосистем, включающих представителей семейства пасленовые (картофель и табак) и фитопатогенную бактерию *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Работа не оставляет равнодушным и вызывает интерес у исследователя, занимающегося проблематикой формирования растительно-микробных патосистем.

В представленной работе была с успехом использована очень грамотная и информативная модельная система, включающая как суспензионные культуры растительных клеток, так и растения. Причем данные, полученные на двух уровнях организации растительного организма, органично дополняют и подтверждают друг друга.

Убедительно продемонстрирована способность грамположительной бактерии индуцировать эффектор-активируемый иммунитет у растений, который выражается реакцией сверхчувствительности как на корнях, так и в надземной части растения. Тщательно прослежена динамика образования внеклеточной перекиси водорода при совместимых и несовместимых взаимодействиях; на основе этих результатов выявлены важные закономерности взаимодействия макро- и микроорганизмов.

Оригинальный подход применен для оценки влияния растительных клеток на процесс образования биопленок исследуемого патогена. Показана роль белков теплового шока (БТШ) в индукции реакции сверхчувствительности. Полученные результаты обладают научной новизной, а также теоретической и практической значимостью.

Несмотря на большое количество достоинств диссертационного исследования, к работе есть ряд вопросов и замечаний (в основном к стилю изложения). В диссертации не совсем четко выстроен план исследования, и при прочтении не в полной мере формируется ощущение целостности работы; на мой взгляд, разделы, связанные с изучением белков теплового шока (БТШ) и формированием биопленок, несмотря на их безусловную значимость самих по себе, не очень «гладко» вплетены в контекст единого диссертационного исследования и выглядят несколько чужеродно. Мне также не хватило аргументов, приведенных автором, в пользу выбора именно БТШ, а не других потенциальных орудий растительно-микробных войн, для исследования специфичных и неспецифичных взаимоотношений в системе паразит-хозяин. Сам автор указывает на то, что «в защитных реакциях

растений на патоген задействовано множество молекулярных участников». Но почему для исследования были выбраны именно БТШ, остается не совсем понятным.

Есть также небольшие замечания к стилю написания. Хочу отметить, что большая часть обзора литературы (от раздела 1.1. до раздела 1.4.) написана очень хорошо. Сразу видно, что автор прекрасно ориентируется в проблеме, исключительно грамотно и последовательно излагает материал хорошим языком, который читается на одном дыхании. Единственное замечание к этой части связано с тем, что автор не дает понять читателю, что некоторые варианты программируемой клеточной смерти (апоптоз) не характерны для растительного организма. Очень хорошо, что автор выделил отдельную главу «выводы из обзора литературы», что не часто можно встретить при написании диссертационных работ. Однако в этом разделе хочется увидеть не просто краткое изложение литобзора, но и четко сформулированные предпосылки для предлагаемого автором исследования.

Результаты и обсуждение, несмотря на их оригинальность и научную ценность, на мой взгляд, написаны несколько «скупо» и временами обрывисто. Кроме того, изложение экспериментальных данных принято делать в прошедшем времени, что не всегда соблюдается автором. В работе иногда путаются понятия «стресса» и «стрессового фактора» (стрессора). Стресс – реакция организма. Стрессовые факторы (неоптимальная температура, патогены) – факторы, вызывающие эту реакцию.

На рисунке 3.16. представлено шесть фотографий, а обозначения даны только А и Б; много времени тратишь на то, чтобы понять, где опыт, а где контроль. На рисунке 3.17. приведено две фотографии инфицированного растения, но фотографии контрольного растения не представлены. Не очень качественная фотография приведена на рисунке 3.3 (особенно в версии автореферата), и поэтому локальные некрозы на корнях выглядят не совсем очевидно. Хотелось бы также узнать мнение автора о том, почему в ходе реакции сверхчувствительности на корнях растений табака отмирают именно клетки кончика корня, но не других его частей. Фотографии клеток картофеля при их со-культивировании с патогеном, на мой взгляд, следовало бы привести, поскольку автор отмечает отсутствие процессов плазмолиза у этих клеток.

Не вполне однозначным выглядит заключение о роли БТШ во взаимодействии клеток картофеля и *Clavibacter*. В случае с картофелем нельзя исключать, что температурное воздействие повышает устойчивость клеток не за счет активации синтеза БТШ, а по другим механизмам. Если в экспериментах по влиянию БТШ на проявление реакции сверхчувствительности у табака автор проводил исследования не только на клетках после температурного воздействия, но и на клетках трансгенных растений со сверхэкспрессией БТШ, то в случае картофеля мутантные формы клеток специфического хозяина проанализированы не были. Как отмечает сам автор, гибель клеток табака и картофеля при инфицировании *Clavibacter* обусловлена разными процессами. Поэтому нельзя исключить, что реакцию

сверхчувствительности при повышении температуры культивирования подавляют именно БТШ, а повышение устойчивости клеток картофеля при этом может определяться механизмами, активируемыми в результате увеличения температуры, но не БТШ.

Не корректно построено предложение в методической части: «Суспензионные культуры клеток, полученных из растений табака трансформированных *Agrobacterium tumefaciens* штамм LBA 4400, несущих вектор pBiCaMV с генами *npt* и *hsp101* в смысловой ориентации под управлением 35S промотора, кодирующего белок теплового шока Hsp101 из *A. thaliana*». Исходя из такой конструкции предложения, можно сделать ложное заключение, что 35S промотор кодирует белок теплового шока.

Результаты экспериментов по влиянию клеток растений на образование бактериальных биопленок указывают на то, что клетки хозяина (и табака, и картофеля) репрессируют образование биопленок всех исследованных микроорганизмов (и *Clavibacter*, и кишечной палочки). На это указывают значения, представленные на диаграммах, относительно контроля – бактериальных культур, инкубируемых в отсутствие растительных клеток; эти значения всегда ниже 100% (от 70% и ниже). Это означает, что в присутствии растительных клеток способность к образованию биопленок у бактерий снижена. Это выглядит достаточно неожиданно (особенно в случае *Clavibacter*), поскольку считается, что растительный организм обычно индуцирует вирулентность фитопатогенов, в том числе, и образование биопленок. Мне хотелось бы узнать, есть ли у автора какое-либо объяснение этого эффекта.

В заключении автор описывает гипотетическую схему эволюции взаимоотношений возбудителя кольцевой гнили картофеля с растениями. Из этой схемы мне не совсем понятно, почему устойчивость некоторых сортов картофеля автор объясняет появлением у них рецепторов, распознающих эффекторные молекулы патогена. Обычно взаимодействие «ген на ген» приводит к качественному эффекту – к 100% устойчивости, которая выражается реакцией сверхчувствительности. В случае устойчивых сортов картофеля такая реакция не активируется, и увеличение иммунитета скорее представляется за счет сверхиндукции РТІ, для которой не характерен гиперчувствительный ответ.

На мой взгляд, в заключении автор излишнее внимание уделил «пересказу» экспериментальной части и оставил за кадром достаточно злободневные вопросы. К таким вопросам, например, относится природа предполагаемых эффекторных молекул исследуемого патогена и возможные механизмы проникновения этих эффекторов внутрь растительной клетки, что необходимо для взаимодействия с соответствующими внутриклеточными R-белками.

Высказанные замечания, ни в коем случае не умаляющие безусловных достоинств диссертационной работы, носят рекомендательный характер, и,

возможно, будут полезны автору при подготовке и планировании предстоящих экспериментальных работ.

Оценивая представленные в диссертации данные, следует заключить, что по актуальности, методическому уровню, научной и практической значимости, новизне сделанных выводов диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

27.05.2015

Научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, к.б.н.

Горшков В.Ю.

420111, г.Казань, ул. Лобачевского 2/31
тел. +7(843) 231-90-35
e-mail: gvy84@mail.ru

