

ОТЗЫВ

официального оппонента 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**

Инфекционные болезни растений ежегодно приводят к значительным потерям урожая, при этом поиск эффективных и экологически безопасных решений без понимания механизмов взаимоотношения растений и патогенных микроорганизмов, а также механизмов развития устойчивости сельскохозяйственных культур к болезням вряд ли возможен. Большинство научных работ, посвященных данной проблеме, выполнено на грамотрицательных фитопатогенах, где очень подробно описаны системы секреции различных эффекторов. В то же время, механизмы вирулентности грамположительных фитопатогенов почти не исследованы. Во многом это связано с особенностями строения клеточной стенки таких бактерий и отсутствием соответствующей системы секреции. Между тем, фитопатогены этой группы в большинстве стран мира отнесены к карантинным, поскольку наносят большой ущерб урожаю сельскохозяйственных культур. Согласно современным представлениям, защита растительного организма от воздействия патогенов определяется функционированием многоуровневой иммунной системы с участием различных структур и механизмов врожденного иммунитета. Исходя из этого, тема выполненной диссертационной работы Ю.В. Омеличкиной, в которой представлены результаты исследований по развитию ответных реакций растений на действие грамположительного фитопатогена *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) на уровне клетки и целого растения при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов, которые могут быть использованы для разработки и использования экологически безопасных средств защиты растений, является **весьма актуальной**. Здесь необходимо отметить, что поскольку существенным фактором вирулентности является способность фитопатогенов формировать биопленки, что определяет колонизацию растения и развитие симптомов заболевания, автор не упустил этот важный аспект в своей работе, который в настоящее время является приоритетным и изучается исследователями практически во всех областях биологии.

Научная новизна выполненных исследований заключается в том, что автором впервые установлено развитие сверхчувствительной реакции (гибель клеток по типу программируемой клеточной смерти) на двух уровнях организации растительного организма – культуры клеток и целого растения при инфицировании табака бактериями *Cms*. Так же впервые выявлено, что сверхчувствительность проявляется не только на листьях растений, но и на кончиках корней табака и сопровождается интенсивным образованием дополнительных боковых корешков. В проведенной работе Ю.В. Омеличкиной впервые установлено, что формирование биопленок у фитопатогена *Cms* зависит от видовой и сортовой устойчивости растения к данному патогену, в то время как образование биопленок у патогена человека и животных – *E. coli* не зависит от резистентности растений. Эти результаты являются очень важными, так как согласно

современным представлениям развитие биопленочных сообществ является одной из основных стратегий выживания бактерий в любой занимаемой ими экологической нише.

Теоретическая и практическая значимость выполненной работы на примере двух фитопатосистем – совместимой и несовместимой, заключается в выяснении механизмов многоуровневого фитоиммунитета, локальной и системной устойчивости и иммунной памяти, которая реализуется у следующих поколений растений. Полученные результаты этих исследований позволяют обосновать новые экологически безопасные подходы защиты растений, заключающиеся в активации собственных иммунных систем растительного организма против патогенов.

Рецензируемая диссертационная работа Ю.В. Омеличкиной изложена на 162 страницах машинописного текста, включающего 37 рисунков и одну таблицу, построена по классической схеме и состоит из Введения, Главы 1 «Обзор литературы», Главы 2 «Объекты и методы исследования», Главы 3 «Результаты и обсуждение», Заключения, Выводов, Списка цитируемой литературы, включающего 292 литературных источника, из них 23 на русском и 269 на английском языках.

Во **Введении** диссертации Ю.В. Омеличкина обосновывает актуальность выбранной темы исследований, формулирует конкретные цель и задачи работы, излагает научную новизну, теоретическую и практическую значимость выполненных исследований. Здесь же указаны Международные и Российские научные конференции, на которых автором были доложены основные результаты диссертационной работы, а так же количество публикаций автора – 24, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, в нескольких из них Ю.В. Омеличкина является первым автором.

Глава 1 «**Обзор литературы**» посвящена описанию и анализу отечественной и мировой литературы по различным аспектам иммунитета растений: паттерн-активируемый иммунитет, эффектор-активируемый иммунитет, а так же «зигзаг модели» врожденной иммунной системы растений. Автор подробно рассматривает реакцию сверхчувствительности при несовместимом типе взаимоотношений между патогеном и растением-хозяином при развитии эффектор-активируемого иммунитета: типы клеточной смерти, молекулярные события реакции сверхчувствительности, ферменты сверхчувствительной гибели клеток. Анализируется системная приобретенная устойчивость у растений, участие белков теплового шока в иммунных реакциях растения, характеризуется возбудитель кольцевой гнили картофеля, описывается способность к формированию биопленок, как фактор патогенности возбудителей заболеваний растений. В завершение этой главы автор диссертационной работы делает заключение, что растения в ходе своей эволюции под действием окружающей среды для своего выживания выработали ряд защитных механизмов от воздействий патогенов, которые сложились в сложную иммунную систему. Врожденная иммунная система растений имеет два уровня: неспецифический иммунитет (РТИ), активируемый широким диапазоном патогенов, и специфический иммунитет (ЕТИ), запускаемый при узнавании эффекторов авирулентного патогена. Способность образовывать биопленки является фактором патогенности и определяет исход взаимоотношений патогена и растения. В то же время, влияние факторов резистентности растения на процесс формирования фитопатогенами биопленок является слабо изученным (их бактериально-вирусный состав, пищевой ресурс, биополимерный матрикс, условия адгезии и др.). Обзор написан ясно и достаточно полно.

В Главе 2 «**Объекты и методы исследования**» Ю.В. Омеличкина подробно описывает объекты исследований: 1. суспензионная культура клеток табака *Nicotiana tabacum* (L.) (сорт Самсун); 2. суспензионные культуры клеток, полученных из растений табака, трансформированных *Agrobacterium tumefaciens* штамм LBA 4400; 3. суспензионная культура клеток картофеля *Solanum tuberosum* (L.) (сорта Жуковский ранний, Луговской, Лукьяновский); 4. суспензионная культура клеток арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* (L.) Неун (раса Columbia); 5. растения табака *N. tabacum*; 6. растения картофеля *S. tuberosum* (сорта Луговской, Лукьяновский); 7. возбудитель кольцевой гнили картофеля – *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*; 8. *Escherichia coli*, штамм XL-1Blue. Таким образом, в качестве объектов исследований были использованы растения, культивируемые *in vitro* и *in vivo*, а так же культуры клеток растений, что позволило изучить развитие реакций иммунитета на двух уровнях организации. Следует отметить, что использование автором диссертации бесклеточного фильтрата культуральной жидкости и термически инактивированной культуры патогена, дало возможность изучить участие бактериальных экзометаболитов в индукции иммунных механизмов растений. Обращает на себя внимание тщательная методическая работа, выполненная Ю.В. Омеличкиной, заключающаяся в большом количестве и повторностях (2-8 кратная) экспериментов по культивированию, выбором культур растений и бактерий (Всероссийская коллекция микроорганизмов, г. Москва; Университет г. Турку, Финляндия; ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха; Украинский НИИ картофельного хозяйства; трансгенные растения – СИФИБР СО РАН, г. Иркутск), различным температурным режимом и экспозицией, а так же использованных методов исследований (заражение культур клеток и растений *in vitro*, *in vivo*, определение выживаемости их, изучение изменения морфологических параметров, определение количества внеклеточного пероксида водорода, выделение суммарного белка, электрофорез в полиакриламидном геле, вестерн-блоттинг, определение молекулярных масс полипептидов, изучение образования биопленок. Полученные результаты обработаны статистически: рассчитаны средние значения и ошибка среднего, для оценки различий между отдельными показателями использован расчет критерия Уилкоксона-Манна-Уитни. Таким образом, в выполненной работе использованы современные методы исследований.

Результаты собственных исследований изложены Ю.В. Омеличкиной в Главе 3 «**Результаты и обсуждение**». При изучении ответных реакций растений *in vitro* на воздействие *Sms* при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов, автор установила различие ответных реакций на действие изучаемого фитопатогена. В системе несовместимых взаимоотношений показана индукция реакций эффектор-активируемого иммунитета на уровне культуры клеток и целого растения. Детально исследована скорость и параметры гибели клеток, а так же характер накопления активных форм кислорода. Инфицирование корневой системы растений табака сопровождалось развитием некрозов в месте контакта с патогеном. Это явление описано автором диссертации впервые и оно заслуживает отдельного внимания, поскольку повреждение меристемы корня несет в дальнейшем перестройки в гормональном статусе растения, что будет сказываться на его иммунных реакциях. Использование бесклеточного фильтрата культуральной жидкости и термически инактивированной культуры патогена позволило установить, что развитие реакций эффектор-активируемого иммунитета в несовместимой

системе табак-*Cms* инициируется термостабильными экзометаболитами. Полученные результаты проиллюстрированы прекрасными цветными фотографиями.

При изучении выживаемости культуры клеток картофеля при воздействии *Cms* было показано, что у устойчивого сорта картофеля происходит развитие более эффективных защитных реакций, чем у восприимчивого. Автором обнаружены существенные различия в характере взаимодействия с патогеном клеток картофеля, различающихся по устойчивости сортов, а так же показана индукция реакций эффектор-активируемого иммунитета у устойчивого сорта картофеля. Исследование морфологии гибели клеток табака показали как на уровне клеток культуры, так и на уровне клеток корневых волосков целого растения табака при воздействии *Cms* активацию специфических реакций эффектор-активируемого иммунитета, а именно развитие программируемой клеточной гибели, реализуемой в форме реакции сверхчувствительности у целого растения.

Ю.В. Омеличкиной при исследовании воздействия *Cms* на клетки культуры табака установлено двухфазное накопление пероксида водорода, остановка движения цитоплазмы, отхождение протопласта от клеточной стенки и быстрая гибель клеток, что свидетельствует об активации механизмов эффектор-активируемого иммунитета. Таким образом, у восприимчивых сортов картофеля происходит подавление защитных специфических реакций, а так же гибель клеток в результате неуправляемого некротического процесса, что характеризует совместимый тип взаимоотношений. В связи с тем, что не достаточно изучены механизмы устойчивости растений, в реализации которых задействованы стрессовые белки, автором диссертационной работы исследованы защитные функции белков теплового шока (БТШ) при заражении растительных культур фитопатогеном *Cms*. Установлено, что комплекс БТШ обеспечивает повышение жизнеспособности клеток картофеля при действии *Cms* за счет реализации неспецифических функций в качестве белков-шаперонов. Показано, что повышение температуры культивирования для индукции синтеза БТШ, при инфицировании культуры клеток картофеля восприимчивого сорта способствует большей выживаемости клеток растения. Таким образом, БТШ влияют на развитие иммунитета при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов.

Существенным вкладом в реализацию поставленных автором диссертации цели и задач исследования, является раздел по изучению влияния устойчивости растений на способность фитопатогена *Cms* формировать в различных условиях биопленки. Ю.В. Омеличкина вполне справедливо отмечает, что большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных условиях существуют в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ – биопленок. В последние годы установлено, что для фитопатогенных и симбиотических микроорганизмов так же характерно формирование биопленок на поверхности и внутри растительного организма, в том числе и фитопатогеном *Cms*, образующим биопленки в сосудистой системе растений картофеля. Автор с использованием дифференционно-интерференционного контраста установил агрегацию бактерий *Cms* на клетках суспензионной культуры табака через 24 часа совместного культивирования – рис. 3.32. Флуоресцентная микроскопия с использованием двойного окрашивания позволила определить и жизнеспособность растительных и бактериальных клеток при формировании биопленочных образований, что демонстрирует микрофотография – рис. 3.33. Количественная оценка образования биопленок проведена методом статического культивирования с красителем «генциан виолет». Было

установлено, что наибольшее образование биопленок *Cms* происходило после взаимодействия бактерий с восприимчивыми к патогену сортами картофеля Лукьяновский – 70 % и Жуковский ранний – 67 %. А при взаимодействии фитопатогена с устойчивым сортом Луговской биопленкообразование составляло 15 % от контроля. Так же была определена способность к образованию биопленок с культурами клеток табака – нетрансформированного и трансформированного геном *hsp101*, что свидетельствует о меньшей эффективности защитных реакций трансгена. Оказалось, что совместное культивирование возбудителя кольцевой гнили картофеля с культурой клеток табака значительно подавляет его способность к образованию биопленок - 9 % от контроля. Это свидетельствует о эффективности иммунных реакций этого растения, так как способность образования биопленок является фактором вирулентности фитопатогенов, колонизирующих сосудистую систему растений. Проведенное сравнительное экспериментальное исследование с условно-патогенным возбудителем заболеваний человека и животных – *E. coli* при культивировании с клетками табака и картофеля, не показало зависимости образования биопленок у нетипичного для растения патогена от сортовой и видовой специфичности их, и составляло 20-30 % от контроля. По результатам этого раздела работы Ю.В. Омеличкиной было сделано заключение, что способность к образованию биопленок у исследованного фитопатогена зависит от иммунного статуса растения, а интенсивность их образования определяется степенью резистентности растения к патогену. По-видимому, это связано с отсутствием сопряженной эволюции у данного патогена с растительными организмами, что привело к отсутствию у патогена специфических эффекторов, а у растений – систем их рецепции, определяющих активацию защитных реакций. Важным в диссертационной работе является наличие в конце каждого раздела этой главы заключений-обобщений с анализом и обсуждением полученных конкретных результатов, что характеризует автора, как сложившегося научного сотрудника.

В **Заключении** диссертации Ю.В. Омеличкина обобщает самостоятельно полученные результаты, анализирует их в целом, сопоставляет с материалами других авторов и выдвигает гипотезу-предположение, по которой эволюция растительного мира, а так же направленная селекция, привели к появлению относительно устойчивых сортов картофеля. Устойчивость таких сортов можно объяснить развитием защитных реакций, активация которых стала возможной при появлении рецепторов, распознающих эффекторные молекулы патогена. Автор полагает, что данную теорию можно проверить в дальнейших исследованиях с помощью самого современного (надо отметить – очень сложного) метода исследований – биоинформационного анализа.

Существенных замечаний по выполненным исследованиям у меня не имеется, в тексте в небольшом количестве встречаются грамматические ошибки. Однако, имеется вопрос к автору: «Где была получена культура условно-патогенной бактерии *E. coli* и в каких условиях с ней проводилась работа?». Результаты работы прекрасно оформлены и подтверждены цветными микрофотографиями, графиками.

Сформулированные Ю.В. Омеличкиной выводы по выполненной диссертации вполне корректны, обоснованы и достоверны, соответствуют поставленной цели и задачам. Личный вклад автора в работу является несомненным и основным (не менее 90 %). Получен большой массив новых оригинальных и обоснованных результатов по актуальной научной проблеме, имеющих теоретическую и практическую значимость.

Важность в практическом отношении заключается в возможном использовании полученных результатов для разработки и использования новых экологически безвредных для человека и окружающей среды подходов защиты растений от вредителей. Автореферат диссертации полностью соответствует ее содержанию.

Заключение. На основании полученных Ю.В. Омеличкиной результатов, изложенных в диссертации и ее автореферате считаю, что выполненная работа является завершенным квалификационным научным исследованием, в котором представлено решение важной научной задачи по выяснению закономерностей развития ответных реакций растений на действие фитопатогена *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* на уровне клетки и целого растения при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов, имеющей существенное значение для физиологии и биохимии растений. Учитывая актуальность выбранной темы исследований, новизну полученных результатов, научную и практическую значимость их, современный методический уровень диссертационная работа **Омеличкиной Юлии Викторовны «Ответные реакции растений на действие фитопатогена *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов»** соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым ВАК Минобразования и науки РФ, утвержденному Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник лаборатории
водной микробиологии Федерального
Государственного бюджетного учреждения
науки Лимнологического института Сибирского
отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН)
Дрюккер Валентин Валерьянович

27.05.2015 г.

664033, г. Иркутск, 33,
ул. Улан-Баторская, 3,
тел. (3952)425-415
e-mail: drukker@lin.irk.ru

Подпись гл.н.с., д.б.н., профессора Дрюккера Валентина Валерьяновича заверяю.

И.о. директора ЛИН СО РАН, к.х.н.



 Маринайте И.И.