

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию
ОМЕЛИЧКИНОЙ Юлии Викторовны

на тему: **ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ НА ДЕЙСТВИЕ ФИТОПАТОГЕНА
CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SSP. SEPEDONICUS ПРИ СОВМЕСТИМЫХ И
НЕСОВМЕСТИМЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЯХ ОРГАНИЗМОВ**
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений

Растения взаимодействуют с огромным числом разнообразных микроорганизмов, небольшая часть из которых являются фитопатогенами. Поиск современных методов борьбы с бактериальными фитопатогенами невозможен без изучения физиолого-биохимических основ взаимодействий растения и микроба. Первый уровень фитоиммунитета – паттерн-активируемый иммунитет (РТИ) является неспецифическим и активируется при распознавании растением молекулярных паттернов (МAMP), присущих всем без исключения микроорганизмам. Детекция эффекторных молекул патогена внутриклеточными рецепторами растения запускает второй уровень иммунитета – специфический эффектор-активируемый иммунитет (ЕТИ). Предполагается, что основные факторы патогенности у грамположительных бактерий присутствуют в экзометаболическом комплексе.

Кольцевая гниль картофеля (возб. *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus* - Cms), приводит к значительным потерям урожая. К основным факторам вирулентности относится способность фитопатогенов формировать биопленки, что определяет колонизацию растения и развитие симптомов заболевания. Влияние факторов резистентности растения на процесс образования фитопатогенами биопленок практически не исследовано. Также не изучены механизмы устойчивости растений, в реализации которых задействованы стрессовые белки. Таким образом, тема исследования актуальна.

Работа выполнена с использованием современных методик и оборудования. Выводы подтверждены результатами статистической обработки экспериментальных данных методами, включающими статистический анализ. Результаты исследования по теме диссертации были представлены на II Всероссийской научно-практической конференции «Развитие физико-химической биологии и биотехнологии на современном этапе» (Иркутск, 2008); Всероссийской научной конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды» (Иркутск, 2009); Общероссийской электронной научной конференции «Актуальные вопросы современной науки и образования» (Красноярск, 2010), Международном симпозиуме «Биохимия – основа наук о жизни», посвященном 150-летию образования кафедры биохимии Казанского федерального университета (Казань, 2013); Всероссийской научной конференции с международным участием «Экосистемы озера Байкал и Восточной Азии» (Иркутск, 2014). По материалам диссертации опубликовано 24 работы, в том числе 5 статей в журналах из списка ВАК РФ.

Впервые установлено, что при инфицировании табака бактериями Cms развитие СЧ реакции (гибели клеток) происходит на двух уровнях организации растительного организма – культуры клеток и целого растения. Впервые выявлено, что СЧ проявляется не только на листьях, но и на кончиках корней табака. Отмечено, что СЧ реакция на корнях сопровождается интенсивным образованием дополнительных боковых корешков. Установлено, что развитие реакций ЕТИ, таких как реакция РСЧ, двухфазное повышение уровня пероксида водорода, у растений табака вызывают как бактерии Cms,

так и их экзометаболиты. Показано двухфазное повышение уровня внеклеточного пероксида водорода при действии Cms на клетки растения-хозяина устойчивого сорта, что свидетельствует о развитии реакций ETI в данной фитопатосистеме. Впервые установлено, что формирование пленок у фитопатогена Cms зависит от видовой и сортовой устойчивостью растения к данному патогену, в то время как, биопленкообразование у патогена человека и животных *E. coli* не зависит от резистентности растений.

Изучение ответных реакций растений на патоген на примере двух фитопатосистем –будет способствовать более полному пониманию механизмов фитоиммунитета, локальной и системной устойчивости. Наряду с чисто теоретическим, эти исследования имеют практическое значение, поскольку позволят обосновать новые экологически безопасные подходы защиты растений, заключающиеся в активации собственных иммунных сил растительного организма против патогенов.

Различия в образовании биопленок у устойчивых и восприимчивых сортов картофеля позволяют разработать новые экспресс-методы отбора различных механизмов устойчивости и приведут к созданию новых устойчивых к кольцевой гнили сортов растений.

Диссертационная работа изложена на 162 страницах, содержит 37 рисунков и 1 таблицу, и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 292 работы, из них 23 отечественных и 269 зарубежных источников. Она представляет собой завершенное научное исследование.

Вместе с тем, можно сделать ряд замечаний по существу работы:

На Стр. 11., в разделе Теоретическая и практическая значимость работы, написано: «Изучение ответных реакций растений на патоген на примере двух фитопатосистем – совместимой и несовместимой будет способствовать более полному пониманию процессов многоуровневого фитоиммунитета, механизмов системной устойчивости и **иммунной памяти, которая реализуется у следующих поколений растений.**» Данное понятие расшифровано в Обзоре Литературы, в том числе приведены возможные механизмы ее эпигенетической регуляции, но оно не имеет отношения к проведенным в диссертационной работе экспериментам, полученным результатам, и сделанным из них выводам. Непонятно, зачем «иммунная память» перечислена в числе областей науки, где будут применены результаты работы.

На Стр. 74, в последнем абзаце снизу написано: «Инфицирование корневой системы растений табака также сопровождалось развитием некрозов в месте контакта с патогеном (Рис. 3.3.). **Данное описано нами впервые.**»

То, что табак является растением-индикатором РСЧ для Cms известно уже давно (Nissinen R, Lai FM, Laine MJ, Bauer PJ, Reilley AA, Li X, De Boer SH, Ishimaru CA, Metzler MC. *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* Elicits a Hypersensitive Response in Tobacco and Secretes Hypersensitive Response-Inducing Protein(s). *Phytopathology*. 1997 Jul;87(7):678-84), также известно, что РСЧ проявляется в корневых волосках устойчивых (иммунных) растений при заражении несовместимыми расами патогенов (например, leg-Grossman S, Golani Y, Kaye Y, Melamed-Book N, Levine A. NPR1 protein regulates pathogenic and symbiotic interactions between *Rhizobium* and legumes and non-legumes. *PLoS One*. 2009 Dec 21;4(12):e8399.). Не ясно, к чему относиться утверждение о первом описании явления некроза корня в месте контакта с несовместимым патогеном. Оппоненту данное явление представляется логично вытекающим из ранее известных фактов.

На стр. 77. описано, что «Инъекция *E. coli* в листья растений табака, предварительно зараженных *Cms*, приводила к появлению локальных некрозов в месте вторичной обработки (Рис. 3.6.)». Появление локальных симптомов не может считаться однозначным для системы бактерия-табак, поскольку зависит от многих факторов – концентрации инфильтрованной суспензии, возраста листьев табака, физиологического состояния растения, и т.д. Было бы правильным провести данный эксперимент с подсчетом динамики популяции бактерий в зоне инфильтрации, что является признанным стандартом в изучении взаимоотношения между растением и бактериями на протяжении последних 30 лет (Bender CL, Stone HE, Sims JJ, Cooksey DA: Reduced pathogen fitness of *Pseudomonas syringae* pv. tomato Tn5 mutants defective in coronatine production. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 1987, 30:272-28).

На стр. 93, Рисунке 3.17. «Морфология клеток корневых волосков *N. tabacum* при совместном культивировании с *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*.» приведена без контроля (инокуляции водой), таким образом, сделанный вывод «На представленных микрофотографиях хорошо заметно отхождение протопласта от клеточной стенки в клетках корневых волосков. Данные результаты согласуются с наблюдениями развития реакции сверхчувствительности на корнях табака при действии *Cms*» не подтвержден документально.

На Стр. 109. Рисунок 3.28. «Выживаемость клеток суспензионной культуры табака *N. tabacum* при совместном культивировании с *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*. NtN – нетрансформированный табак; NtC1 – табак, трансформированный геном *hsp101*, процент от контроля. Контроль – жизнеспособность соответствующих культур табака при внесении среды С.» выживаемость клеток трансформированного табака растет после инокуляции и снижается только к третьим суткам совместного культивирования. Данный факт стимулирования роста популяции трансгенной культуры табака не имеет объяснения в тексте диссертации.

Там же: «Полученные результаты дают основания предполагать, что Hsp101 может быть задействован в механизмах развития программируемой гибели клеток растений.» Из представленных результатов можно заключить, что Hsp101 ПРОТИВОДЕЙСТВУЕТ программируемой гибели клеток растений, что совпадает с ранее известной об этом гене и о других белках теплового шока информации, см.:

Lee JH, Yun HS, Kwon C. Molecular communications between plant heat shock responses and disease resistance. *Mol Cells*. 2012 Aug;34(2):109-16

Jelenska J, van Hal JA, Greenberg JT. *Pseudomonas syringae* hijacks plant stress chaperone machinery for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 20;107(29):13177-82

Сделанные замечания, однако, не снижают ценности выполненной работы и не влияют на сделанные выводы, а скорее служат дополнением к обсуждению полученных данных.

Таким образом, диссертация **ОМЕЛИЧКИНОЙ Юлии Викторовны** на соискание ученой степени кандидата биологических наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи оценки развития ответных реакций растений на действие фитопатогенных бактерий, имеющей существенное значение для соответствующей отрасли знаний, а именно, физиологии и биохимии растений, что соответствует требованиям п. 7 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Официальный оппонент,
ведущий научный сотрудник
ФГБУН Центр «Биоинженерия» РАН, д.б.н.

Александр Николаевич Игнатов

Г. Москва, проспект 60-летия Октября, дом 7.корп. 1. 117312. Тел. +7 916 6712147
Е-мейл: an.ignatov@gmail.com

Подпись руки Игнатова А.Н. удостоверяю,

ученый секретарь ФГБУН
Центр «Биоинженерия» РАН, к.б.н.

Н.Г. Степанова

Степанова Наталья Глебовна, nat-step@biengi.ac.ru. Тел: 8 (499) 135-20-21.

25/05/2015

Дата Гербовая печать

