

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации Амины Галеевны ДАМИНОВОЙ «Формирование растительно-микробной патосистемы *Nicotiana tabacum* – *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043: ультраструктурный и физиологический аспекты», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.05 – физиология и биохимия растений, 03.02.03 – микробиология.

От микроорганизмов, составляющих самый многочисленный домен живого, в существенной степени зависят и нормальный рост растений, и их выживаемость, в том числе, в неблагоприятных условиях. Генетическое и метаболическое разнообразие микроорганизмов указывают на их важную роль в осуществлении многих биохимических процессов у растений. Вместе с тем, экстраординарные различия свойств микроорганизмов ведут к тому, что изучение их биологии по сравнению с растениями становится весьма трудной задачей.

Фитопатогенные бактерии рода *Pectobacterium* вызывают у растений-хозяев «мягкие гнили», являющиеся причиной существенных потерь хозяйственно важных растений, как во время их роста и развития, так и в ходе их последующего хранения. Сейчас известно, как пектобактерии взаимодействуют со своими растениями-хозяевами, но сведений об их жизни вне хозяйского организма крайне мало. Иными словами, многие черты экологического взаимодействия пектобактерий и растений остаются неизвестными. Будучи типичными некротрофами, пектобактерии могут поражать широкий набор растений-хозяев, тогда как *Pectobacterium atrosepticum*, скорее, видо-специфичны. Каковы причины повышенной специфичности *Pectobacterium atrosepticum* – вопрос, пока не получивший надлежащего ответа. Колонизируя растения, *Pectobacterium atrosepticum* могут не вызывать видимых симптомов заболевания, а уровень «поражаемости» зависит от внешних условий. Какая стратегия используется *Pectobacterium atrosepticum* между периодами роста растения-хозяина?

Секвенирование генома *Pectobacterium atrosepticum* позволило по-новому взглянуть на образ жизни бактерий этого вида. Оказалось, что не только размер геномов *Pectobacterium atrosepticum* (штамм 1043) и энтеробактерий, инфицирующих животных, сходны, но и имеются общие регуляторы, которые контролируют работу генов, ответственных за развитие заболевания у растений. Действительно, некротрофная природа симптоматической стадии вызываемого пектобактериями заболевания и роль в ней ферментов деградации клеточной стенки растений (PCWDE), которая и ранее предполагалась, получила генетическое обоснование. Оказалось, что разные виды пектобактерий имеют сходный набор PCWDE в качестве инструментов, мацерирующих ткани хозяина. Стало понятным, что определённая специфичность в отношении растения-хозяина связана не с набором PCWDE у разных видов *Pectobacterium*, а скорее, с факторами, которые пока не охарактеризованы. Отчасти по этой причине, в последнее время исследования пектобактерий фокусируются на изучении их как патогенов, «работающих» на ранних стадиях инфекции в качестве биотрофов. Уже из этого

перечисления, не претендующего на завершённость, очевидна актуальность диссертационной работы Амины Галеевны Даминовой. В этой работе решены задачи, которые позволяют не только понять, благодаря каким морфологическим и физиологическим особенностям *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 развивается инфекционное заболевание растений табака (*Nicotiana tabacum*), но и ответить на вопрос о том, работа каких защитных систем растения-хозяина вовлекается во взаимодействие с фитопатогенными бактериями.

Диссертационный труд, изложенный на 199 машинописных страницах, по структуре соответствует сложившимся стандартам. В диссертации последовательно располагаются введение, далее следуют три главы: Обзор литературы, Материалы и методы исследования, Результаты и их обсуждение, – заключение, выводы, список цитируемой в диссертации литературы, который включает 419 наименования (занимает 51 страницу). Изложенный в диссертации материал иллюстрируют 19 рисунков и 1 таблица.

Обзор литературы (53 страницы), на первый взгляд, представляется излишне объёмным. Однако далее понимаешь, что А.Г. Даминова, по сути дела, составила два обзора: один, касающийся «микробиологической стороны» проблемы, тогда как другой суммирует сведения о молекулярных событиях, происходящих в растениях-хозяевах. Рассматривая с такой позиции содержание первой главы диссертации, подчеркну, что обзор литературы информативен и удачно структурирован. На мой взгляд, основная мысль, которую А.Г. Даминова целенаправленно проводит в своём обзоре, состоит в демонстрации того, что для преодоления «гонки вооружения» между высшими организмами и фитопатогенными бактериями необходимо глубоко понимать экологические особенности микроорганизмов, которые способны не только к агрессии, но и мирному сосуществованию со своими хозяевами.

Доводы диссертанта настолько обоснованы, что вместе с автором мы приходим к выводу: основная проблема состоит в том, что пока недостаточно оснований для того, чтобы сформулировать физиолого-биохимические критерии, которые позволили бы определить, а, возможно, и предсказать, какая из возможных стратегий взаимодействия будет реализовываться в системе паразит-хозяин.

Далее А.Г. Даминова вполне разумно заключает, что, с одной стороны, необходимо установить причины и условия, определяющие избирательное поведение пектобактерий, которые заставляют их действовать с позиции «грубой силы», что ведёт к разрушению клеточной стенки растения – самой серьёзной преграды на пути фитопатогена. С другой стороны, присутствие в геномах бактерий рода *Pectobacterium* генов, имеющих у биотрофов, а также латентный характер инфекций, вызываемых ими, позволяют думать, что взаимодействие бактерий с растениями может обеспечиваться посредством функционирования молекулярных механизмов, носящих более тонкий регуляторный характер.

Обзор написан профессионально, он формирует исчерпывающее представление об обсуждаемых в нём проблемах. Он демонстрирует потенциал А.Г. Даминовой к обобщению и логичному изложению имеющегося материала. Проведённый анализ

литературы показывает также способность А.Г. Даминовой адекватно оценивать имеющиеся в литературе сведения.

У меня есть небольшое замечание, касающееся формы представления сведений в первой главе диссертации. Возможно, восприятию информации могли бы помочь несколько рисунков/схем, суммирующих основные положения, содержащиеся в обзоре. Особенно это касается параграфов, посвящённых, например, типам секреции, а также эндогенным регуляторам роста растений.

Описание результатов диссертационного исследования А.Г. Даминовой предварены изложением использованных в работе методов (глава 2 «**Материалы и методы исследования**»). Объектами исследований служили растения табака (*Nicotiana tabacum*) и фитопатогенные бактерии *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043. Мне импонирует выбор растений табака в качестве растения-хозяина, поскольку проявление симптомов заболевания у индивидуальных растений табака стабильнее, чем у основного для *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 хозяина – растений картофеля.

Подчеркну, что использованные в работе методы адекватны для решения задач диссертационного исследования. За исключением приёмов, применённых для выделения различных фракций полисахаридов (параграф 2.12), все остальные методические протоколы изложены А.Г. Даминовой точно и чётко.

В связи с этой частью работы хотелось задать вопрос об использовании терминов вариабельность и неоднородность симптомов. Это слова-синонимы? И ещё, как следует понимать выражение автора о невозможности «объективно дифференцировать процесс формирования патосистемы на различные стадии и вследствие существенной неоднородности экспериментальных данных» (параграф 2.1)?

Прежде чем перейти к рассмотрению центральной главы диссертации (глава 3 «**Результаты и их обсуждение**»), считаю необходимым подчеркнуть, что бактерии способны поселяться в разных тканях растения-хозяина, а именно: в паренхиме или ксилеме, которые имеют различные физические, химические и иммунные свойства. Так, ксилема не богата полезными для роста бактерий соединениями, тогда как скорость диффузии, например, воды, по ксилеме весьма значительна. Напротив, паренхима, богатая подходящими для бактерий элементами питания, оснащена средствами защиты против патогенов. То есть, даже у единичного растения-хозяина бактерии оказываются в серьёзно отличающихся условиях. Это, в свою очередь, может быть одной из причин различий в организации бактериальной популяции в течение всего периода взаимодействия растения и патогена.

Действительно, определив динамику численности популяции *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 в инфицированных растениях табака, определив способности бактерий этого вида к фенотипической диссоциации, а также выявив изменения ультраструктуры клеток *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 в зависимости от условий культивирования, А.Г. Даминова

- впервые описала, как происходит процесс диссоциации популяции фитопатогенных бактерий в организме растения-хозяина;

- выявила фенотипы бактерий, образование которых происходит тканеспецифично или на определённой стадии патогенеза;
- показала, что популяционный цикл *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 в организме растения завершается переходом бактерий в покоящиеся формы, которые могут быть отнесены к жизнеспособным, но некультивируемым клеткам.

Следовательно, логично предположить, что с наличием выявленных субпопуляций бактерий, скорее, связаны специфические функции, позволяющие бактериям завершить свой жизненный цикл в растении.

В связи с этой очень качественно выполненной частью работы у меня возник вопрос, выходящий за рамки задач, над решением которых работала А.Г. Даминова.

Признано, что *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 – внеклеточный патоген, который не умеет проникать внутрь растительной клетки. Однако А.Г. Даминова показала, что и в клетках паренхимы растения-хозяина бактерии обнаруживаются, причём в этом случае ею зарегистрированы серьёзные изменения ультраструктуры (параграф 3.3.1, рис. 5). Каким образом бактерии проникают в цитоплазму клеток паренхимы?

Одной из самых впечатляющих и даже интригующих находок А.Г. Даминовой представляется впервые выявленные в инфицированных растениях табака формируемые микробными клетками «многоклеточные» структуры, названные бактериальными эмболами. Образуюсь в сосудах ксилемы, а также в строгом соответствии с названием, эти структуры занимают весь просвет сосуда, затрудняя транспорт по ксилеме. Диссертант справедливо полагает, что образование эмбол способствует колонизации патогеном растения-хозяина, поскольку возникающий в растении дефицит воды может повышать его восприимчивость, тогда как для бактерий снижение интенсивности транспорта воды может оказаться благоприятным и для осуществления жизненного цикла в организме хозяина, и для колонизации бактериями подземных частей растения-хозяина за счёт торможения восходящего тока.

По мнению диссертанта, за формирование бактериальных эмбол может отвечать «освобождающаяся из клеточной стенки гранулярная субстанция» (стр. 107 диссертации). Вот она интрига: что представляет собой эта субстанция? И диссертант сохраняет интригу до самого конца главы 3.

По моему мнению, здесь видится прямой путь к изучению метаболомов ксилемы/флоэмы инфицированных и здоровых растений. Такие исследования могут помочь иначе взглянуть на то, как у растения-хозяина связаны метаболизм и его регуляция, а также найти ответ на вопрос, почему флоэма – место не слишком пригодное для фитопатогенных бактерий.

Согласно современным представлениям, ответ на фитопатогены опосредован и зависит от того, насколько активно работают эндогенные регуляторы роста растений. Действительно, в зависимости от стиля жизни патогенов, атакующих растения, хозяева синтезируют один или больше фитогормонов, что необходимо для обеспечения наилучшей защиты. Резистентность растений к пектобактериям может быть результатом индукции либо жасмонат/этилен-, либо салицилат-зависимых систем защиты.

Сейчас не вызывает сомнений, что crosstalk между путями передачи сигналов названных гормонов – центральное событие, определяющее приоритетность возникающего ответа. Пути передачи сигналов жасмоновой и салициловой кислот могут «взаимодействовать» на нескольких уровнях, причём в большинстве случаев это «взаимодействие» носит характер антагонизма.

В своей работе А.Г. Даминова показала, что в ответ на заражение *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 у растений табака активируются защитные механизмы, инициируемые жасмоновой и салициловой кислотами. При бессимптомной инфекции работает салицилатный путь, тогда как при типичной инфекции – жасмонатный. Основанием для такого заключения стали результаты, полученные при анализе уровня транскриптов маркерных генов, характер экспрессии которых отражает эффективность работы пути передачи соответствующего сигнала.

В целом, у меня нет серьёзных возражений в связи с этой частью работы. Соответствующие эксперименты выполнены аккуратно, и полученные в них результаты обсуждены в контексте существующих в настоящее время представлений. Однако считаю, что лучшим доводом в пользу сделанного А.Г. Даминовой заключение было бы инструментальное измерение содержания эндогенных жасмоновой и салициловой кислот, а также использование растений с генетически изменёнными компонентами, ответственными за инициацию работы пути передачи сигнала соответствующего регулятора роста.

Наконец, мы приблизились к развязке, а именно: диссертант приводит данные, касающиеся природы «освобождающейся из клеточной стенки гранулярной субстанции». А.Г. Даминова показала, что для построения матрикса бактериальных эмбол микроорганизмы могут использовать растительные полимеры. Точнее, пектиновые вещества, которые изменяли характер связывания с клеточной стенкой. Особый интерес представляет обнаружение в полости сосудов ксилемы инфицированных растений фрагментов рамногалактуронана I, с боковыми цепями которого могут связываться фенольные соединения. Окисляясь, последние могут «сшивать» полисахариды с образованием высокомолекулярных продуктов распада пектина.

Немедленно возникает вопрос: кто ответственен за окисление фенольных соединений? Диссертант отвечает: «Окислять фенольные соединения могут активные формы кислорода (АФК), рост продукции которых происходит при развитии инфекционного процесса». Оценив при помощи флуоресцентного окрашивания DCF DA продукцию АФК, А.Г. Даминова показала, что в отличие от здоровых растений у инфицированных АФК выявлялись в клеточных стенках сосудов первичной ксилемы, а также в люмене сосудов, колонизированных *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043.

Здесь считаю нужным заметить, что использование флуоресцентных красителей для определения АФК, к сожалению, лишь отвечает на вопрос: есть/нет, больше/меньше. Тогда как для заключения о том, что при выявленном уровне АФК может происходить окисление фенольных веществ, необходимо количественно оценить продукцию АФК, чтобы капитализировать их роль в этом процессе.

У меня есть несколько замечаний технического характера, относящихся к рисункам в параграфе 3.5. Первое, в подписях к рис. 13 и 14 хотелось бы видеть, что скрывается под аббревиатурами Р и V_i ? Второе, в подписях к рис. 13 и 14 стоило бы написать, что указано на рис. 13 и 14 стрелками. Третье, в подписи к рис. 17 и/или в параграфе 2.14 следовало бы написать о временах удержания использованных стандартов.

Я не сомневаюсь, что в целом материал экспериментальной части диссертационной работы А.Г. Даминовой приоритетен не только с теоретической точки зрения, но должен заинтересовать, в том числе, и тех специалистов, интересы которых направлены на разработку новых способов контроля бактериозов растений.

Итоги экспериментальной части диссертационной работы подведены в *Заключении*, где суммированы полученные в работе данные. Очевидная краткость заключения оправдана, поскольку в предыдущей главе полученные результаты обстоятельно обсуждены.

Завершают диссертацию восемь **выводов**, в которых отражена теоретическая значимость исследования. Выводы сформулированы конкретно и ясно; они вполне согласуются с задачами, стоявшими перед диссертантом, и основаны на результатах большого числа проведённых экспериментов.

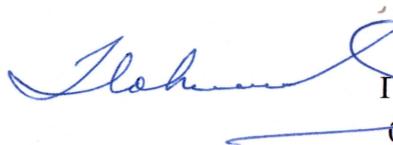
Следует специально подчеркнуть, что все главы диссертации написаны чётко, логично и хорошим языком. Описание результатов исследования сопровождаются превосходными фотографиями и аккуратно выполненными рисунками, что позволяет по заслугам оценить качество работы. В рукописи практически отсутствуют опечатки. Тем не менее, отмечу такую погрешность редакционного плана, как использование ссылок на собственные статьи как на литературные источники, тогда как, по существу, это основные работы, опубликованные по теме диссертации.

Переходя к итоговой оценке работы, подчеркну, что А.Г. Даминова представила хорошо продуманное, законченное научно-квалификационное исследование, многие результаты которого получены впервые и имеют не только теоретическую, но и практическую значимость. Поставленные в работе задачи, способы их экспериментального решения, полученные результаты и уровень их теоретического осмысления соответствуют современному уровню знаний о морфологических и физиологических особенностях клеток бактерий и растений в процессе формирования растительно-микробных патологических систем. Работа выполнена на должном методическом и теоретическом уровне, достоверность результатов не вызывает сомнения. Выводы автора вполне корректны и аргументированы результатами экспериментов. По результатам диссертационного исследования имеются три статьи, которые опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Основные положения диссертации представлены на научных конференциях как российских, так и международных. Автореферат адекватно отражает содержание экспериментальной части работы.

Считаю, что во всех отношениях, включая формальные параметры, диссертационная работа А.Г. Даминовой отвечает критериям, сформулированным в Разделе II «Положения о порядке присуждения учёных степеней», а автор работы Амина

Галеевна Даминова искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.05 – физиология и биохимия растений, 03.02.03 – микробиология.

Доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярных основ
внутриклеточной регуляции
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки
Института физиологии растений
им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук


Г.Б. Новикова
03.12.2014 г.

Контактные данные официального оппонента

Почтовый адрес: 127276, гор. Москва, ул. Ботаническая, 35. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Телефон: +7 (499)231-83-68.

Адрес электронной почты: gv.novikova@mail.ru

ПОДПИСЬ
ЗАВЕРЯЮ
ЗАВ. ОТД. КАДРОВ

Новикова Г. В.



Вязанова Е. Г.

