

Отзыв официального оппонента на диссертационную работу

Китаевой Анны Борисовны

"Сравнительный анализ организации тубулинового цитоскелета в ходе развития симбиотических клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum*) и люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula*)", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 - физиология и биохимия растений

Одним из важнейших факторов, определяющих продуктивность растений, является их взаимодействие с микроорганизмами, что делает необходимыми фундаментальные исследования растительно-микробных сообществ. Симбиоз между растениями и микроорганизмами является одним из подобных сообществ, известным с античных времен. Симбиотические отношения между бобовыми растениями и почвенными бактериями из группы *Rhizobium* приводят к формированию нового органа, корневого клубенька, в клетках которого происходит процесс фиксации атмосферного азота. Позитивное влияние симбиоза известно давно, наличие клубеньков на корнях учитывается, как фактор оптимизации роста, но выращивание растений с использованием только симбиотического азота не имеет широкого распространения. Это связано с тем, что ряд условий, определяющих эффективность симбиоза, не исследованы, либо не учитываются. Недостаточно изучены пока и факторы, от которых зависит поддержание огромной популяции живых бактерий в цитоплазме растительных клеток. Исследования в этой области необходимы не только для выявления оптимальных условий для продуктивной азотфиксации, но и для создания новых растительно-микробных сообществ, необходимость в которых возникнет в будущем.

Диссертационная работа А.Б.Китаевой, в которой исследуется тубулиновый цитоскелет клеток корневого клубенька, экологической ниши для азотфиксирующих бактерий, является интересным и актуальным исследованием.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 145 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания методов и объектов исследования, результатов, обсуждения, заключения и списка литературы.

Обзор литературы содержит два подраздела. Первый подраздел касается индукции и рецепции факторов нодуляции и развития корневого клубенька, а также формирования симбиотической ткани. Приведено описание развития корневого клубенька, от начальных

стадий инфицирования до стадии азотфиксации. Описаны сигнальные пути и гормональная регуляция, лежащие в основе образования корневого клубенька. Второй подраздел описывает непосредственно формирование, функции и изменения тубулинового цитоскелета в неинфицированных и инфицированных клетках клубенька. Обзор литературы хорошо оформлен, содержит 13 схематических рисунков, обобщающих основные этапы формирования симбиоза, обмен сигналами между растением-хозяином и ризобиями, а также структуру корневых клубеньков. Также даны схемы организации микротрубочек в растительной клетке.

Глава 2 посвящена описанию методов и объектов исследований. А.Б.Китаева использовала в своих опытах по исследованию паттерна цитоскелета несколько мутантных линий гороха посевного: SGEFix--1 (*Pssym40*), SGEFix--2 (*Pssym33*), SGEFix--3 (*Pssym26*), а также люцерны слабоусеченной: *Mtefd-*, TR3 (*Mtipd3*), *Mtdnf1-1*. Фенотипы корневых клубеньков, образуемых на корнях мутантных растений, характеризуются такими дефектами развития симбиоза как невозможность выхода бактерий в цитоплазму хозяина, либо незрелость бактериоидов, что позволило А.Б.Китаевой исследовать взаимосвязи между этапом развития инфицированной клетки и изменением цитоскелета. Использование нескольких мутантов двух видов растений для экспериментов, проведенных в 10-кратной повторности и с выборкой в 10-20 клубеньков при каждом эксперименте, обеспечивает высокую достоверность полученных результатов. А.Б.Китаева подробно описывает методы визуализации микроскелета, а также объясняет и обосновывает необходимость подбора и изменения условий приготовления препаратов.

В работе использованы современные методы исследований, включающие визуализацию микротрубочек иммуноцитохимическими методами и использование конфокальной микроскопии. Диссертантом был также разработан количественный метод анализа роста микротрубочек и 3-d реконструкции тубулинового цитоскелета.

В главе 3 представлены результаты исследований. Автор детально описывает разработанные для исследований методы. Для исследования были использованы как трансгенные растения, несущие репортерную конструкцию с GFP, так и иммунолокализация с антителами к тубулину.

Представленные в главе иллюстрации (Рис.16-45), выполненные с высоким разрешением, подтверждают эффективность методов, разработанных А.Б.Китаевой. Как исследователь, работающий с микроскелетом, я должна подчеркнуть, что автором выполнены очень трудоемкие эксперименты, использовано до 200 клубеньков каждого генотипа, и анализ проведен по клеткам, находящимся в различных стадиях развития.

Анализ полученного материала позволил А.Б.Китаевой провести достоверное сравнение формирования паттерна микротрубочек в клубеньках двух видов бобовых растений, а также выполнить контрольное исследование с использованием модификатора полимеризации тубулина оризалина. Соискатель выполнила количественную оценку роста микротрубочек, что помогло построить объемную трехмерную реконструкцию и диаграммы процесса развития цитоскелета.

В главе 4 представлено обсуждение результатов. Глава посвящена описанию формирования и изменения цитоскелета в зависимости от фазы развития инфицированной и неинфицированной клетки. Так, показано, что организация микротрубочек в клетках меристемы клубеньков гороха и люцерны, а также в неинфицированных клетках, была практически одинаковой. В инфицированных клетках обоих видов инфекционная нить сопровождалась тубулиновыми микротрубочками, которые образуют канал, в котором располагается инфекционная нить. Инфекционные капли также были ассоциированы с микротрубочками.

Но на более позднем этапе развития симбиоза А.Б.Китаева выявила различия между паттерном микротрубочек в клубеньках с различной морфологией бактериоидов в клубеньках растений разных видов.

Тот факт, что паттерн тубулинового микроскелета зависит в значительной степени от бактериального партнера, очень интересен. Было показано, что выход бактерий стимулирует перестройку цитоскелета и создает условия для изодиаметрического роста клетки, что, в свою очередь, позволяет колонии бактерий находится в цитоплазме клетки-хозяина. После проведения наблюдения на контрольных клубеньках, А.Б.Китаева использовала мутантную линию SGEFix--2 (*Pssym33*), у которой в большинстве клеток клубенька выход бактерий не наблюдается, для подтверждения этого предположения. Сравнивая инфицированные и неинфицированные клетки, соискатель также подтвердила роль бактерий, находящихся в цитоплазме клетки-хозяина, в изменении организации микроскелета неинфицированной клетки после инфекции, что было ранее показано и другими исследователями. Применение количественного анализа путем вычисления углов ориентации микротрубочек подтвердило визуальные наблюдения.

В разделах "Заключение" и "Выводы" А.Б.Китаева суммировала данные, и сформулировала выводы, подчеркнув результаты, являющиеся новыми для данной области исследования.

Оценка оформления диссертационной работы

Работа написана грамотным языком, данные изложены последовательно и внятно, иллюстрации имеют высокое разрешение и хорошее качество.

Рукопись Автореферата соответствует содержанию диссертации, а также содержит все выносимые на защиту положения.

Научная новизна

В результате проведенных исследований создана универсальная методика визуализации клеточных структур клубеньков. Впервые выявлена трехмерная структура тубулинового цитоскелета в клетках всех гистологических зон клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*, показано участие тубулинового цитоскелета в расположении симбиосом в азотфиксирующих клетках *P. sativum* и *M. truncatula*. Автором выявлена связь в изменении организации кортикального цитоскелета и выхода бактерий в растительную клетку с переходом к изодиаметрическому росту и созданием возможности колонизации цитоплазмы клетки-хозяина. А.Б.Китаевой впервые проведен количественный анализ организации тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков *P. sativum* и *M. truncatula*.

Научная и практическая значимость результатов

Полученные соискателем результаты расширяют современные представления о развитии симбиоза, формировании инфицированной клетки и роли каждого из партнеров симбиоза в этом процессе. Результаты могут быть использованы также для подготовки лекций для студентов биологических специальностей.

Достоверность результатов

Достоверность результатов обеспечена использованием нескольких мутантов со схожим фенотипом, в 10-кратной повторности и с выборкой в 10-20 клубеньков при каждом эксперименте, а также проведением исследований на современном оборудовании в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ и «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» ФГБУН БИН РАН им В.Л. Комарова с применением высокотехнологичных средств анализа данных.

Апробация результатов

Материалы диссертации были представлены на VII съезде Общества физиологов растений, нескольких конференциях и симпозиумах, включая 12ой европейской конференции по азотфиксации (2016 г., Будапешт, Венгрия), III (XI) международной ботанической конференции молодых ученых (2015г., Санкт-Петербург), 4ом

международном симпозиуме «Сигналинг и поведение растений» (2016 г, Санкт-Петербург), 10ом международном симпозиуме по изучению корня (2018г., Тель-Авив, Израиль).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Замечания и вопросы

1. В обзоре литературы можно было бы шире осветить роль актинового цитоскелета в связи с тубулиновым цитоскелетом. Я особенно рекомендую сделать это в случае, если А.Б.Китаева планирует опубликовать данный обзор.

2. Стр.30. В описании формирования клубеньков с "детерминированным" типом роста, ссылка (Maunoury *et al.*, 2008) устарела. В настоящее время известно, что меристема в этих клубеньках существует, и активна в течение 2-3 недель, так же как и в люпиноидных клубеньках (Gavrin *et al.*, 2017).

3. В главе "Результаты", которая содержит большой объем визуальной информации, стоило бы сделать обобщения по мере описания материала.

Вынесенные оппонентом замечания не затрагивают научных доводов автора и не умаляют значимости представленной работы.

Заключение

Диссертационная работа Китаевой А.Б. является законченным научным исследованием в области физиологии и биохимии растений. По своей актуальности, новизне результатов, а также теоретической и практической значимости диссертационная работа соответствует требованиям к диссертационным работам изложенным в Постановлении Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г "Положении о порядке присуждения ученых степеней" а ее автор, Китаевой А.Б., заслуживает присуждения ей степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 - физиология и биохимия растений

Зав. Группы растительно-микробных взаимодействий,

ФГБУН Институт физиологии растений

им. К.А. Тимирязева РАН,

в.н.с., к.б.н.

Елена Эриковна Федорова

Адрес: Москва, 127276, ул.Ботаническая, 35

тел. (499) 678-54-00,

*email:elenafedorova06@mail.ru

ПОДПИСАНА
ЗАВ. ОТД. ЗАДАТОК
20.11.2018
Федорова Е.Г.
Тимирязева Е.Г.