

Отзыв

официального оппонента

на диссертацию Китаевой Анны Борисовны

на тему: «Сравнительный анализ тубулинового цитоскелета в ходе развития симбиотических клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum*) и люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula*)»

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 03.01.05 - Физиология и биохимия растений

Горох и люцерна – это важнейшие сельскохозяйственные культуры, которые являются основным и важным источником белка для человека и животных. Кроме того, важной особенностью этих объектов является способность в результате симбиоза с почвенными бактериями – ризобиями, накапливать атмосферный азот. Для использования бобовых в практических целях необходимо развитие и получение новых фундаментальных знаний, понимание молекулярно-генетических механизмов, определяющих рост и их развитие. Клубеньки, которые формируются в процессе симбиоза, являются хорошей моделью для изучения процесса дифференцировки растительной клетки, так как при формировании клубенька в клетках происходит перестройка многих цитологических и физиологических процессов, подготавливающих клетку к переходу на новый уровень для размещения ризобий и осуществлению азотфиксации. Изучение этих процессов, цитологических особенностей их протекания лежат в основе столь значимого процесса, приводящего к накоплению азота. Поэтому изучение элементов цитоскелета, его реорганизации при формировании симбиотического клубенька, становится важным и необходимым для решения как фундаментальных проблем дифференцировки и формирования растительной клетки в ходе симбиоза, так и практических задач, обеспечивающих процесс азотфиксации и продуктивность бобовых растений с высокой способностью к накоплению белка.

Диссертационная работа Китаевой Анны Борисовны посвящена изучению организации тубулинового цитоскелета на поздних стадиях развития симбиотических клубеньков гороха посевного и люцерны слабоусеченной. В работе автором поставлено пять задач, в состав которых входит как разработка и создание методики иммунолокализации тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков бобовых, сравнительный

анализ его организации у гороха и люцерны, так и сравнительный анализ его функции в распределении симбиосом в клетках клубеньков с проведением сравнительного количественного анализа характера распределения микротрубочек в инфицированных и неинфицированных клетках. Важной задачей явилась разработка методики иммулокализации тубулинового цитоскелета в клетках клубенька, что привело к созданию универсальной методики в целом. Предложенный метод позволил выявить трехмерную структуру тубулинового цитоскелета в различных гистологических зонах в клубеньках гороха посевного и люцерны слабоусеченной.

Широкий пласт исследований, проведенных автором, позволил показать, что микротрубочки образуют матрицу для роста инфекционных нитей, поддерживают инфекционные капли и подготавливают выход бактерий в цитоплазму. Впервые автором показано участие тубулинового цитоскелета в расположении симбиосом в азотфиксирующих клубеньках бобовых растений. Впервые выявлена связь, затрагивающая изменение организации кортикального цитоскелета и выхода бактерий в растительную клетку, что создает условия для заселения инфицированной клетки симбиосомами. Показано, изменение организации цитоскелета способствует переходу клетки к изодиаметрическому росту. В работе автором впервые проведен количественный анализ организации тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков двух видов бобовых растений, что следует отнести к существенным достижениям, позволившими выявить видоспецифические различия, связанными с рисунками эндоплазматических микротрубочек, вовлеченных в распределение симбиосом в цитоплазме клеток клубеньков.

К основным существенным результатам диссертанта относятся следующие:

1. Эндоплазматические микротрубочки направляют развитие инфекционных структур – инфекционных нитей и капель и организуют пространственное расположение симбиосом в клубеньках *P.sativum* и *M.truncatula*.
2. Распределение микротрубочек в инфицированной клетке в клубеньках гороха и люцерны определяет ее изодиаметрический рост, способствует увеличению объема клетки, с целью размещения максимального количества в ней симбиосом.
3. Видоспецифические различия, описанные по характеру эндоплазматических микротрубочек, вовлеченных в распределение симбиосом в растительной клетке клубеньков двух видов бобовых, связаны с морфологией бактериоидов.

Полученные результаты имеют явное практическое значение. Так разработанная автором универсальная методика визуализации тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков может быть использована и используется для визуализации других клеточных структур. Полученные результаты могут в мере быть использованы в педагогическом процессе при чтении курсов - «Биотехнология растения», «Селекция растений», «Цитология».

В ходе выполнения диссертационной работы автором использован значительный арсенал методов, включающий методы цитологии, гистологии, методы молекулярной биологии и биотехнологии. Работа проведена 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 высокотехнологических средств анализа данных. Все использованные методы необходимы для решения поставленных в работе задач.

Работа выполнена на уникальной коллекции гороха посевного ВНИИСХМ (6 линий и мутантных форм) и люцерны слабоусеченной (1 сорт и 3 мутантные линии). Все использованные генотипы достаточно полно охарактеризованы в работе. Совокупность использованных методов и использование генетических коллекций сделали данную работу важной, оригинальной и ценной с точки зрения фундаментальных исследований и практики.

Диссертация содержит все необходимые традиционные разделы, изложена на 145 страницах печатного текста, содержит 1 таблицу и 46 рисунков. Список цитированной литературы содержит 202 источника, основная часть из которых на английском языке.

В главе 1 «Обзор литературы», который изложен почти на 50 страницах подробно изложены современные данные о развитии симбиотических клубеньков в процессе онтогенеза – от стадии развития инфекции до формирования зрелого клубенька. В главе дано описание молекулярно-генетических аспектов сигнальных путей при передаче, описана роль гормонов при формировании клубеньков. В данной главе дано подробное описание роли цитоскелета в процессе клубенькообразования. В обзоре описаны изменения в организации цитоскелета при инфицировании растительных клеток ризобиями. Однако, как пишет автор, ранее не было выявлено, как тубулиновые микротрубочки участвуют в росте

инфекционных нитей и формировании инфекционных капель, а также распределении симбиосом в клетках клубенька, не выявлена трехмерная структура тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков в различных его гистологических зонах. Тем самым, автором четко обоснована актуальность, фундаментальная и практическая значимость, поставленных в диссертационной работе задач. Обзор литературы составляет треть всей диссертации. С точки зрения оппонента, его можно было бы значительно сократить за счет первых двух подглав, содержание которых изложено не только в статьях, но в монографиях и учебных пособиях. В конце обзора имеется небольшое заключение, в котором обоснована цель диссертационной работы и перечислены задачи.

Для решения поставленных задач автору требовался комплексный подход, основанный на применении широкого спектра современных методов молекулярной биологии, конфокальной микроскопии, биотехнологии с применением методологии генетического анализа. Все используемые методы, а также материалы подробно описаны в Главе 2 — Материалы и методы.

Обращает на себя внимание четкое описание растительного материала, даны ссылки на авторов, которые получили используемые в работе мутантные формы. Хорошо подобраны мутанты и гороха посевного, и люцерны слабоусеченной, изменения в которых, по сравнению с исходной формой, затронули такие признаки как формирование инфекционной нити и капель, развитие бактериоидов и др., важных для решения поставленных задач.

В главе « Результаты » описаны результаты исследований. В работе получен интересный и большой по объему экспериментальный материал, который хорошо задокументирован, четко представлен и обсужден. Представленные в работе фотографии высокого качества.

Глава включает 6 подглав, посвященных изучению организации тубулинового цитоскелета в клетках меристемы, в инфицированных клетках из зоны инфекции, в неинфицированных клетках клубенька в сравнение у двух видов бобовых растений. Отдельно представлены результаты, описывающие организацию эндоплазматических микротрубочек вдоль инфекционных нитей и капель, представлены результаты по организации тубулинового цитоскелета в инфицированных клетках зоны азотфиксации. Диссертанту удалось получить трехмерные изображения организации тубулинового цитоскелета в клетках бобовых для каждой гистологической

зоны клубенька. Следует еще раз отметить высокое качество фотографий, представленных в данной главе.

Таким образом, диссертантом проанализирован тубулиновый цитоскелет в клубеньках двух видов бобовых растений, которые формируют клубеньки недетерминированного типа с постоянно действующей меристемой и имеют характерную зональность клубенька. В основе экспериментов лежал разработанный автором метод иммулокализации с использованием флуоресцентных меток. Для каждого генотипа метод был оптимизирован, что позволило описать организацию микротрубочек во всех типах клеток клубеньков. Диссертантом предложена схема организации кортикальных и эндоплазматических микротрубочек в различных зонах корня и клубенька. Выявлены различия в организациях микротрубочек у мутантов (Pssym33 и TR3) по сравнению с исходной формой, что предполагает роль данных генов в регуляции организации кортикальных микротрубочек. Сделан важный вывод о роли цитоскелета в развитии и функционировании инфекционных капель.

В диссертации имеется общее заключение, в котором суммированы многочисленные результаты проведенного исследования и определено их место в изучении роли цитоскелета в клеточных процессах. Обоснованность и достоверность заключений и выводов, сделанных в работе не вызывает никаких сомнений.

Следует отметить, что автору присущ ясный и логичный стиль изложения, способность четко и понятно донести свои мысли до читателя, написана работа не плохим русским языком. Исключение составляют единичные иностранные термины, например, паттерн, который вполне можно заменить русскими словами — характер, рисунок, тип. Не следует так часто использовать страдательный залог - работа не делалась, а вы ее делали и т. д. У оппонента не возникло серьезных замечаний. Даже количество опечаток в работе находится на уровне статистической погрешности.

В качестве рекомендации - количество выводов должно соответствовать количеству поставленных в работе задач. Семь выводов для кандидатской диссертации — это много. Кроме того, понимая, что статистика и цитология, как правило, мало совместимы, оппоненту не хватило данных о том, сколько клубеньков использовали в анализе с каждого растения и сколько растений каждого генотипа было проанализировано? Наблюдали ли изменчивость по изучаемым признакам в пределах растения, различия между растениями при анализе каждой отдельной формы? Кроме того, при изучении роли гена в

конкретном процессе, сегодня мало выявить различия по изучаемому признаку между мутантом и исходной формой. Для доказательства следует использовать подходы по выключению гена, например, на основе РНК-интерференции или использовать методы генной инженерии для получения растений со сверхэкспрессией гена интереса. Однако, высказанные пожелания никак не умоляют общей высокой оценки работы. Оппонент с большим интересом прочитала работу, получила эстетическое удовольствие от фотографий, оценила хорошо подобранную растительную модель, подбор мутантов и их использование для сравнительного анализа процессов клеточной дифференцировки в ходе растительно-микробных взаимодействий. Несомненно, работа А.Б. Китаевой вносит серьезный вклад в генетику развития растительной клетки в процессе симбиотических взаимоотношений. В целом, полученные автором результаты могут быть использованы как в фундаментальных исследованиях при изучении цитологии растительной клетки, так и могут войти в курсы лекций, читаемых в ВУЗах страны на биологических факультетах.

Автореферат оформлен по всем правилам, в нем отражены основные положения диссертационной работы, полно представлен и отлично проиллюстрирован экспериментальный материал, полученный в ходе работы. Название диссертации отражает комплекс проведенных исследований. Работа выполнена на хорошем методическом уровне, а полученные результаты являются достижением в области биологии, посвященной изучению роли тубулинового цитоскелета при формировании клубеньков у бобовых растений.

Материалы диссертации были представлены на многочисленных всероссийских и международных научных мероприятиях и опубликованы в журналах списка ВАК, отечественных и зарубежных журналах, в том числе относящихся к Q1 квартилю.

Заключение. Диссертационная работа Анны Борисовны Китаевой «Сравнительный анализ организации цитоскелета в ходе развития симбиотических клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum*) и люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula*)», представленная на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 - Физиология и биохимия растений, является законченной научно-квалификационной работой, полностью соответствующей критериям пп.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.,

предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Китаева Анна Борисовна, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 — Физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент:

Лутова Людмила Алексеевна

д.б.н. профессор, профессор кафедры

генетики и биотехнологии Санкт - Петербургского

государственного университета

ЛИЧНУЮ ПОДПИСЬ

Лутова Л.А.

ЗАВЕРЯЮ

ЗАМЕСТИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ СПбГУ
Н.А. ЖОРЕЛЬСКАЯ



Санкт-Петербург, ноябрь 2018г.

12 ноября 2018 г.