



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации (МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

410049, г.Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13.
Тел.: (845-2) 97-04-44, 97-04-03. Факс: (845-2) 97-04-44, 97-03-83.
E-mail: mail@ibppm.ru, http://ibppm.ru
ОКПО 04740828, ОГРН 1026402489013, ИНН/КПП 6451105279/645101001

№ 106-01-1.3-501 от 21.11.2018г.
на _____ от _____



«Утверждаю»

ВРИО директора ИБФРМ РАН

д.б.н., профессор

Л.Ю. Матора

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН)
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

Диссертационная работа А.Б. Китаевой посвящена изучению структурной организации тубулинового цитоскелета в процессе формирования симбиотических клубеньков гороха и люцерны. Тема исследования несомненно **актуальна**, поскольку расширяет теоретические представления о строении, функционировании и особенностях формирования симбиотического сообщества, как примера уникального взаимодействия кардинально различных по своей организации живых существ - растений и микроорганизмов. Полученные автором данные вносят существенный вклад в понимание клеточных механизмов дифференцировки клеток и развития инфекционных структур симбиотического клубенька, что является теоретической основой для

решения селекционных задач и создания адаптивных растительно-микробных систем, не только имеющих высокую эффективность азотфиксации, но и способных поддерживать ее на стабильном уровне в неблагоприятных условиях.

Научная и практическая значимость и новизна результатов диссертационной работы А.Б. Китаевой не вызывает сомнений. Автором детально рассмотрена структурная организация тубулинового цитоскелета в клетках всех гистологических зон клубеньков гороха и люцерны. Впервые показано, что микротрубочки создают матрицу для роста инфекционных нитей и поддерживают инфекционные капли, подготавливая выход бактерий в цитоплазму клеток клубеньков. В исследовании впервые отражено участие тубулинового цитоскелета в расположении симбиосом в азотфиксирующих клетках гороха и люцерны, а также выявлена связь в изменении организации кортикального цитоскелета и выхода бактерий в растительную клетку. Созданная автором **универсальная методика** визуализации тубулинового цитоскелета клубеньков находит применение в исследованиях более широкого круга клеточных структур.

Анализ содержания работы. Диссертационная работа А.Б. Китаевой состоит из Введения, четырёх глав, Заключения и Выводов. Текст диссертации изложен на 145 страницах. Список литературы содержит 202 источника. Во **Введении** автором обоснована актуальность проблемы, сформулированы цели и задачи исследования, приведена информация о научной и практической значимости работы, а также положения, выносимые на защиту. В первой главе диссертации представлен **литературный обзор**, состоящий из двух подразделов. В них изложены результаты анализа литературы, отражающие современные представления об основных закономерностях развития симбиотического клубенька, особенностях его регуляции и участии тубулинового цитоскелета в его формировании. В литературном обзоре автор дает убедительные обоснования выбора цели, объектов и перспективности диссертационной работы.

Во второй главе приведено детальное описание объектов и методов исследования. В качестве объектов выбраны два представителя семейства Бобовых - горох посевной (*Pisum sativum*) и люцерна слабоусеченная (*Medicago truncatula*). В работе наряду с лабораторными линиями гороха и люцерны использован ряд мутантных линий, отличающихся по структуре симбиотических клубеньков. Для инокуляции корней гороха использовали штаммы *Rhizobium leguminosarum*, а для инокуляции люцерны - *Sinorhizobium*

meliloti. В исследовании применены иммунохимические и цитологические методы, в том числе методы иммунолокализации с использованием флуоресцентных меток, а также лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.

Третья и четвертая главы посвящены описанию результатов исследований автора и их обсуждению. Следует отметить, что центральным звеном диссертационной работы является разработка авторской методики визуализации цитоскелета в клетках клубеньков гороха и люцерны. За основу взята методика фиксации и иммунолокализации корней кукурузы, которая существенно доработана автором. Кроме того, для визуализации тубулинового цитоскелета в клубеньках люцерны были использованы трансгенные растения, несущие ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), слитый с фрагментом гена, кодирующего белок млекопитающих, ассоциированный с микротрубочками MAP4. Работа была выполнена в сотрудничестве с Национальным институтом сельскохозяйственных исследований (Тулуза, Франция). В итоге была показана ограниченность применения репортерных флуоресцентных белков для изучения тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков трансгенных растений.

Отдельный раздел посвящен подробному описанию организации тубулинового цитоскелета в клетках различных гистологических зон в клубеньках как лабораторной, так и мутантных линий гороха и люцерны. Организация тубулинового цитоскелета рассмотрена в клетках меристемы, неинфицированных и инфицированных клетках, вдоль инфекционных нитей и вокруг инфекционных капель, а также в клетках, расположенных в зоне азотфиксации. Показана трехмерная структура тубулинового цитоскелета в клетках всех гистологических зон клубеньков. Кроме того, проведен анализ действия оризалина на тубулиновый цитоскелет. Автором убедительно доказана связь между процессом дифференцировки бактериоидов и формированием сети эндоплазматических микротрубочек в клубеньках гороха и люцерны.

При анализе тубулинового цитоскелета в клетках различных гистологических зон клубеньков гороха и люцерны диссертанту удалось выявить визуально различающиеся паттерны микротрубочек в инфицированных и неинфицированных клетках. Для количественного подтверждения этих различий был выполнен анализ организации тубулинового цитоскелета с использованием специальной программы Микрофиламент аналйзер (MicroFilament Analyzer). Успешная попытка автора количественно

охарактеризовать полученные визуально результаты безусловно заслуживает особого внимания, поскольку такого рода изыскания нечасто встречается в научных исследованиях, базирующихся на использовании микроскопии, как «описательного» метода.

Стоит также отметить, что изложение результатов сопровождается многочисленными высококачественными иллюстрациями, дающими четкое представление об организации тубулинового цитоскелета в клетках клубеньков гороха и люцерны. Обсуждение результатов лаконично и понятно.

Достоверность приведенных в диссертации данных обеспечена качественной литературной проработкой темы, набором эффективных методов исследования и их умелым использованием, публикационной активностью автора и апробацией работы на научных форумах.

Выводы диссертации ясно следуют из ее результатов и соответствуют поставленным задачам. Автореферат диссертации достаточно полно отражает содержание работы. Основные результаты исследования нашли отражение в 25 публикациях, среди которых 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК. Материалы диссертации апробированы на многочисленных конференциях и симпозиумах. К отмеченной выше **практической значимости** работы следует добавить, что ее результаты могут быть использованы при разработке специальных лекционных курсов по физиологии растений и микробиологии.

Каких-либо замечаний по существу анализируемой работы у нас нет. В качестве **пожеланий** по ее оформлению можно отметить следующее:

1. Глава «Обсуждение результатов» имеет относительно небольшой объем по сравнению с главой «Результаты», и в этом случае было бы логично, на наш взгляд, объединить эти две главы в одну, что способствовало бы более четкому представлению материала и его лучшему восприятию читателем.

2. В разделе «Материалы и методы» дана лишь ссылка на статью с описанием методики агробактериальной, трансформации корней штаммом *Agrobacterium rhizogenes*. Было бы полезным, на наш взгляд, привести здесь более детальное описание этой методики.

3. Подписи к некоторым рисункам в обзоре литературы (рисунки 2-4) могли бы быть не столь лаконичными.

Перечисленные пожелания не имеют принципиального характера и не влияют на весьма позитивную оценку данной диссертационной работы.

Таким образом, диссертационная работа Китаевой Анны Борисовны «Сравнительный анализ организации тубулинового цитоскелета в ходе развития симбиотических клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum*) и

люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula*)» по объему, актуальности, научной новизне и практической значимости является законченным исследованием, отвечающим требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, и полностью соответствует критериям, установленным п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, как научно-квалификационная работа, содержащая решение научной задачи, обеспечивающее получение новых знаний по механизмам бобово-ризобияльного симбиоза, а ее автор, Китаева Анна Борисовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 - физиология и биохимия растений.

Работа обсуждена на заседании лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН (протокол № 62 от 20 ноября 2018 г.).

Научный сотрудник лаборатории иммунохимии
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института биохимии
и физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук
к.б.н.

Ю.В. Венжик

Заведующий лабораторией иммунохимии
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института биохимии
и физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук
д.х.н., профессор

С.Ю. Щеголев

410049, Саратов, проспект Энтузиастов 13.
Телефоны: 8 (8452) 970 444; 8 (8452) 970160
E-mail: shegolev_s@ibppm.ru, jul.venzhikl@gmail.ru

Подписи С.Ю. Щеголева, Ю.В. Венжик заверяю
Ученый секретарь ИБФРМ РАН к.б.н.

О.Г. Селиванова