

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Дорониной Татьяны Валерьевны
на тему: «Особенности структуры антиподальных клеток зародышевого
мешка пшеницы на стадиях дифференцировки и программируемой
клеточной гибели»
по специальности 1.5.22 – клеточная биология**

Актуальность избранной темы

Актуальность темы диссертационного исследования Т.В. Дорониной не вызывает сомнений — прежде всего ввиду недостаточной проработки вопроса об особенностях структуры и функций политенных хромосом растений и механизмах физиологически детерминированных преобразований антиподальных клеток, наблюдаемых в ходе их программируемой клеточной гибели на ранних этапах морфогенеза тканей зерна. Вместе с тем подобного рода знания, несомненно, имеют фундаментальное значение, в том числе при разработке практических подходов, направленных на улучшение показателей урожайности сельскохозяйственных (социально значимых) культур.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

Научная новизна диссертации Т.В. Дорониной в первую очередь состоит в детальной характеристике компонентов ядра и цитоплазмы на этапах дифференцировки и программируемой клеточной гибели полиплоидных антиподальных клеток, ультраструктуры политенных хромосом и цитоплазматических органелл, а также преобразований микротрубочек и актинового цитоскелета. Автором продемонстрировано образование разрывов ядерной ДНК, а также выход цитохрома С из митохондрий в цитоплазму в ходе программируемой гибели антиподальных клеток. Результаты диссертационной работы Т.В. Дорониной следует учитывать при проведении практических занятий и чтении лекций студентами биологических факультетов университетов по цитологии и эмбриологии растений.

Объем, структура и содержание работы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Диссертационная работа написана по традиционному плану, изложена на 211 с. машинописного текста и содержит разделы: «Введение» (6 с.); «Обзор литературы» (58 с. — 4 подраздела, 31 рис., 2 табл.); «Материалы и методы» (11 с. — 4 рис.); «Результаты» (81 с. — 6 подразделов, 83 рис., 3 табл.); «Обсуждение результатов» (26 с. — 8 подразделов, 9 рис., 2 табл.); заключение и выводы (6). Список цитированной литературы содержит 190 источников, из которых 160 — на иностранных языках.

Во введении к диссертации автор, в частности, определяет актуальность проблемы, степень проработки в литературе вопроса о строении политенных хромосом растений, об ультраструктуре антиподальных клеток и гибели антиподальных клеток при целлюляризации эндосперма; сформулированы цели и задачи работы, положения, выносимые на защиту.

Раздел «Обзор литературы» свидетельствует о научной эрудиции автора и охватывает основные аспекты в контексте дискуссионных вопросов, которые остаются на сегодняшний день, в рамках тематики исследования. Особое внимание уделено политенным хромосомам (с акцентом на особенностях их строения в клетках растений), морфодинамике зародышевого мешка и антиподальных клеток злаков, молекулярно-биохимическим особенностям программируемой клеточной гибели в клетках растений по сравнению с клетками животных. Обзор литературы заканчивается обобщающим заключением, что заслуживает особой похвалы. Лично мне читать обзор было интересно — он создает комплексное представление об особенностях строения и функций антиподальных клеток и политенных хромосом растений, в частности злаков.

Раздел «Материалы и методы» в целом свидетельствует о высоком профессионализме диссертанта в качестве экспериментатора. В работе использован ряд классических и современных цитологических методик,

включая методы иммуоцитохимии, TUNEL, FISH, трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), ПЦР в реальном времени (RT-ПЦР).

В разделе «Результаты» подробно изложены все этапы экспериментальной работы, которые проиллюстрированы высококачественными рисунками — микрофотографиями цито- и гистологических препаратов, электронными микрофотографиями, графиками и диаграммами.

С моей точки зрения, наиболее важными результатами являются:

- 1) определение основных временных и морфологических этапов дифференцировки и гибели антиподальных клеток в оплодотворенных и неоплодотворенных зародышевых мешках гексаплоидной пшеницы *Triticum aestivum* сорта «московская 39»¹, одного из лучших сортов озимой пшеницы;
- 2) составление подробного морфологического «атласа» ультраструктуры ядра и цитоплазмы этих клеток на разных этапах функционально детерминированной гибели.

Обсуждение полученных результатов носит непротиворечивый характер и в целом демонстрирует умение автора анализировать и правильно интерпретировать результаты собственных наблюдений в свете имеющихся представлений. Ценность представляют оригинальные схемы, демонстрирующие преобразования антиподальных клеток при их дифференцировке и гибели.

Критические замечания и вопросы к дискуссии

Принципиальных возражений, замечаний и вопросов, которые могли бы повлиять на положительную оценку диссертационной работы Т.В. Дорониной, у меня нет. Те же вопросы, которые возникли, вызваны научным интересом и носят дискуссионный или редакционно-технический характер.

¹ Обращаю внимание диссертанта, что названия сортов сельскохозяйственных культур правильно писать именно таким образом (§ 198 Правил русской орфографии и пунктуации / Под ред. В.В. Лопатина. — М.: АСТ-ПРЕСС ШКОЛА, 2020. — 432 с.).

1. Вопросы и замечания по обзору литературы

1.1. Недоумение вызвал рис. 1, г, на котором изображена схема строения пуфа политенной хромосомы (рис. 1, Е, из обзора: Stormo, Fox, 2017). Красные кружки на этой схеме, связанные с хроматидами (тяжами ДНК), обозначены как рибосомы (? — Д.Б.), от которых отходят транскрипты мРНК (??). Что делают там рибосомы, на чем они «сидят», если речь идет о синтезе мРНК; как понимать отхождение удлиняющихся транскриптов мРНК от рибосом? Или это какая-то ошибка, а кружками обозначены комплексы РНК-полимеразы II?

1.2. По моему мнению, обзор литературы можно было бы значительно сократить — во-первых, за счет исключения множества рисунков (микрофотографий), напрямую заимствованных из первоисточников. Тем более что некоторые микрофотографии (например, рис. 10) при перепечатке потеряли информативность: детали, о которых идет речь в тексте, на них не видны, при этом обозначения на таких рисунках далеко не всегда расшифрованы в подписях. Во-вторых, сам текст обзора мне показался перегруженным частными сведениями, видоспецифическими деталями, напрямую не имеющими отношения к конкретному исследованию.

2. Следующие вопросы и замечания возникли **по разделу «Материалы и методы»**, в котором некоторые методики описаны недостаточно подробно или информация вообще отсутствует. Нередко соответствующая информация приведена в тексте *где-то потом* (например, в разделе «Результаты»), а не в «методическом» разделе, как принято.

2.1. Не указана толщина ультратонких срезов и ускоряющее напряжение электронного микроскопа.

2.2. Гены интереса, праймеры, использованные для РТ-ПЦР, перечислены не в главе «Материалы и методы» (в разд. 3.4 указан лишь референсный ген), а только в разд. 4.6 главы «Результаты».

2.3. Не описан протокол реакции Фёльгена, например, условия гидролиза ДНК и время окрашивания. Фуксинсернистую кислоту (реактив Шиффа) готовили сами или использовали покупной раствор?

2.4. Что служило контролем при использовании методики TUNEL?

2.5. В разд. 3.2.10 («Для выявления микротрубочек и актиновых филаментов...», с. 80) написано, как выявляли микротрубочки, а как выявляли F-актин — нет.

2.6. Не описана процедура селективного выявления РНП на ультратонких срезах по Бернару² — отмечено только, что «препараты не осмировались» (с. 80), но метод-то предполагает не только это, но и специфическое контрастирование.

2.7. Не перечислены методы статистической обработки результатов, которые упоминаются лишь в соответствующих местах раздела «Результаты», а в разд. 3.6. указаны только компьютерные программы.

2.7. На с. 74 допущена опечатка, которая может ввести в заблуждение. Написано: [DAPI] «в разведении 1 мкл на 1 мл», в то время как концентрацию DAPI указывают в мкг/мл. Имеется также опечатка, недопустимая при упоминании названий химических соединений: «кокоделатный» вместо какодилатный [буфер] (с. 76).

3. Замечания и вопросы по разделу «Результаты»

3.1. Говоря о результатах окрашивания DAPI (с. 88), разве можно говорить о хромосомных территориях, их сближении/объединении? Что автор понимает под хромосомными территориями в данном контексте?

3.2. На с. 96, говоря о финальных этапах гибели клеток антиподальных комплексов, автор пишет: «отчетливо видны *сохранившиеся* (выделено мною. — Д.Б.) ядрышки (рис. 49, б, г)». При этом на рисунках (фазово-контрастных изображениях) стрелки указывают на тела правильной сферической формы, имеющие размер, судя по масштабному отрезку, около

² Французская фамилия Bernard по-русски пишется/читается Бернар.

50 мкм. Если диаметр всего антиподального комплекса составляет около 300 мкм (с. 91), а количество антипод в этом комплексе у пшеницы составляет 20–27 (с. 165), то разве могут ядрышки иметь такие размеры? Или речь идет о слиянии в 1-2 капли ядрышек из нескольких дегенерирующих клеток? Прошу диссертанта дать разъяснения, поскольку оппонент не является специалистом в области эмбриологии растений и может видеть «что-то не то».

3.3. Наиболее принципиальным замечанием к работе служит неверная, с моей точки зрения, интерпретация ядерных телец, называемых автором «мини-ядрышками».

Почему автор, судя только по результатам серебрения и окрашивания с помощью антител к фибрилларину, решила, что эти тельца содержат «латентные ядрышковые организаторы» (с.107), ведь гибридизацию нуклеиновых кислот с зондами к рДНК, насколько я понимаю, не проводили ни в диссертационном исследовании, ни в опубликованной работе диссертанта (Доронина и др., 2019), ни в более ранней работе других авторов (Лазарева, Ченцов, 2004).

Почему эти тельца рассматриваются как (мини-)ядрышки? Очевидно, что характер серебрения таких «мяк» (мне категорически не нравится такая аббревиатура, но это дело вкуса. — Д.Б.) существенно отличается от характера серебрения истинных ядрышек (рис. 61). Результаты обработки антителами к фибрилларину (рис. 62, б) также, на мой взгляд, говорят о различиях между ядрышками и «мини-ядрышками» — по крайней мере по общеморфологическим признакам (размеру, форме).

Изучая в начале XX в. нейроны млекопитающих и используя различные методики импрегнации тканей азотнокислым серебром, испанский нейробиолог, нобелевский лауреат Р. Кахаль (Cajal, 1903, 1910) идентифицировал особые ядерные органеллы, которые на рубеже XX–XXI вв. были названы в его честь тельцами Кахалья (ТК) (Gall et al., 1999; Gall, 2000). В обзорах, посвященных вкладу Кахалья в исследования ядерных

органелл нейронов (Lafarga et al., 2009, 2017), приведены оригинальные рисунки Кахалья и соответствующие им изображения, полученные в наше время, в том числе с помощью серебрения. Глядя на них (например, рис. 5, А, в обзоре [Lafarga et al., 2017]) и сравнивая с рис. 61 в диссертации Т.В. Дорониной, у меня практически не остается сомнений в том, что тельца, описываемые автором как мини-ядрышки, не что иное, как ТК.

В настоящее время ТК наряду с ядрышками — наиболее хорошо и всесторонне изученные ядерные органеллы, в том числе в клетках растений (Love et al., 2017), начиная с клонирования коилина растений и первого описания ТК в клетках *Pisum sativum* (Beven et al., 1995). В настоящее время нет никаких сомнений, что, несмотря на определенную степень «родства» по природе, некоторым функциям и молекулярному составу, ядрышки и ТК — различные (distinct) ядерные органеллы, хотя они и находятся в тесном функциональном (а иногда и структурном) единстве, о чем свидетельствуют сотни оригинальных работ и десятки современных обзоров.

Что касается 2'-O-метилтрансферазы фибрилларина, то он, будучи ко́ровым белком sno/scaРНП класса C/D, в одинаковой степени является мажорным компонентом и ядрышек, и ТК. Об этом давно известно в отношении клеток и животных (Raška et al., 1990; Andrade et al., 1991), и растений (Barneche et al., 2000; Love et al., 2017).

Таким образом, ни серебрение, ни локализация фибрилларина сами по себе не могут служить критериями для идентификации описываемых телец как ядрышки, пусть даже «мини». Не являются доказательством природы «мини-ядрышек» как ядрышек и результаты окрашивания акридиновым оранжевым (АО) (рис. 66, б), поскольку и ядрышки, и ТК содержат множество РНК, а АО не способен отсементировать рРНК от, например, ТК-специфических РНК (scaРНК).

По результатам обработки срезов EDTA по Бернару автор справедливо отмечает, что гетероморфные ядерные тела антиподальных клеток пшеницы содержат РНП (с. 171). Понятно, что сейчас говорить о природе этих РНП-

телец преждевременно. По данным ТЭМ можно лишь предположить, что ТК представляет структура, изображенная на рис. 75, в. (также рис. 6, в, в статье: Доронина и др., 2019). Как бы то ни было, я настоятельно рекомендую автору в своих дальнейших публикациях воздержаться от однозначной трактовки данных ядерных органелл как ядрышки (мини-ядрышки), дабы избежать возможных недоразумений.

3.4. На с. 125, говоря об ультраструктурной морфологии ядрышек в ходе гибели антиподальной клетки, автор пишет: «в них [ядрышках] выявляются многочисленные гетерогенные фибриллярные центры». На каком основании автор решила, что это ФЦ?

3.5. Я не совсем понял, что автор понимает под «трехмерной реконструкцией», выполненной с помощью эпифлуоресцентного микроскопа, который, как указано в диссертации (с. 80), использовали для наблюдения клеток, обработанных антителами к ЭПР (KDEL) и аппарату Гольджи (58K/FTCD). В статье автора (Доронина и др., 2019) отмечено, что это «Z-проекция 25 срезов» (подпись к рис. 7 в этой статье) — но, по-моему, такие картины называются максимальной проекцией, а не 3D-реконструкцией.

3.6. Рис. 68 представлен в черно-белом варианте, в то время как в подписях обозначены каналы — голубой (DAPI) и красный (фибрилларин), неразличимые на рисунке.

4. *Разделу «Обсуждение»*, на мой взгляд, не хватило четкости изложения.

4.1. Вместо того чтобы идти по схеме «собственный результат — обсуждение (с данными литературы) — вывод», автор начинает подразделы в некотором смысле с краткого «обзора литературы» и повторения результатов, при этом собственно обсуждение «размывается». В конце некоторых подразделов не хватает краткого резюме/вывода³.

³ Например, раздел 5.3 «Структура политенных хромосом антиподальных клеток» заканчивается фразой: «Наличие фибрилл толщиной 0,2-0,3 мкм в ядрах клеток было показано для пшеницы (Блюденов, Конарев,

4.2. Схемы (рис. 119, 120), иллюстрирующие периоды дифференцировки и гибели антиподальных комплексов, выполнены качественно, но на них отсутствуют подписи, и для публикации, например, такие рисунки неинформативны.

4.3. Таблицы 6 и 7 со всей очевидностью должны были располагаться не в разделе «Обсуждение», а в разделе «Результаты».

5. **Выводы** диссертации в целом аргументированы и следуют из полученных результатов и их обсуждения, однако формулировка вывода 4, по сути, является не выводом, а повторением результатов.

6. Как и в любой большой работе, встречаются неудачные и (или) спорные фразы/выражения, опечатки, орфографические⁴ и пунктуационные ошибки.

6.1. Нельзя писать «судьба ... органелл прослежена на ультраструктурном уровне» (с. 51) — со ссылкой на отдельную (статичную) электронную микрофотографию (рис. 18, б), по которой невозможно «проследить судьбу» чего бы то ни было.

6.2. Вместо «первые/вторые» в настоящее время принято писать «первичные/вторичные» [антитела] (англ. primary/secondary).

6.3. Неудачным представляется словосочетание «неструктурированный хроматин» (с. 83) — как такая сложная *структура* как хроматин может быть неструктурированной?

В порядке **дополнительной дискуссии** предлагаю диссертанту ответить на вопрос, который возник при знакомстве с обзором литературы (с. 50), о возможности амплификации генов ядрышкового организатора в антиподальных клетках — со ссылкой на морфологическую работу (Петрова

1978) и фибрилл толщиной 0,3 – 0,6 мкм, анастомозирующих друг с другом, было показано для ячменя (Петрова и др., 1985)». — Ну и что же из этого следует?

⁴ Например, неверно написаны слова «ядрышкоподобный», «меченый» (в знач. прил.), трехъярусный *etc.* — все подобного рода недочеты перечислять в отзыве не буду.

и др., 1985). Известно, что амплификация рДНК в первую очередь характерна для ооцитов животных с гипертранскрипционным типом оогенеза. Какие, кроме морфологических данных, имеются доказательства амплификации рДНК *в клетках растений*, какова степень распространения этого феномена, что известно о его механизмах?

Следует отметить, что все указанные замечания и вопросы не умаляют значимости научно-теоретической значимости диссертационного исследования, проведенного Т.В. Дорониной, не подвергают сомнению выводы, сделанные по результатам экспериментальной работы, которые полностью достоверны, аргументированы и подтверждены на большом объеме экспериментального материала. Ряд вопросов, которые имеют исключительно дискуссионный характер, вызван исключительно научным любопытством оппонента в ходе знакомства с яркой и интересной работой.

Результаты диссертации достаточно полно и всесторонне освещены в необходимом количестве публикаций; во всех диссертант является первым автором; таким образом, вклад диссертанта во всех публикациях является определяющим. Автореферат соответствует тексту диссертации и дает полное представление об объеме, всех этапах экспериментальной работы, полученных результатах и выводах.

Заключение

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.22. – клеточная биология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание

ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Доронина Татьяна Валерьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – клеточная биология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
главный научный сотрудник Лаборатории морфологии клетки
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН)

БОГОЛЮБОВ Дмитрий Сергеевич

 20.03.2023

Контактные данные:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.00.25 – «Гистология, цитология, клеточная биология» (1.5.22 – Клеточная биология).

Адрес места работы:

194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН),
лаборатория морфологии клетки;
Тел.: +7(812)2971829; e-mail: dmitr@incras.ru.

Подпись сотрудника Института цитологии РАН
Д.С. Боголюбова удостоверяю:

