

**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 темы диссертационной работы:

Антиподальные клетки зародышевого мешка выполняют трофическую и барьерную роль при формировании зерновки растений. Они располагаются между материнскими клетками семяпочки и развивающимся эндоспермом, сохраняясь у культурных злаков достаточно продолжительное время после оплодотворения. Ранее было показано, что в процессе развития антиподального комплекса пшеницы на этапе дифференцировки в ядрах клеток антипод формируются гигантские политетные хромосомы, транскрибирующие РНК, кодирующие белки, которые обеспечивают развитие и дифференцировку эндосперма на стадии ценоцита. Структура политетных хромосом растений отличается от классических политетных хромосом двукрылых, и они изучены намного хуже. Мало известно и о процессах дифференцировки и деградации антиподального комплекса растений. Ранее установлено, что целлюляризация эндосперма запускает программируемую клеточную гибель антиподального комплекса, которая на настоящий момент также изучена недостаточно. Нет четкого представления как о процессах, происходящих в ходе онтогенеза при дифференцировке и гибели клеток антиподального комплекса, так и о контролирующих их механизмах. В связи с тем, что нарушение структуры антиподального комплекса приводит к формированию щуплого зерна, исследование ранних этапов морфогенеза зерна представляет не только теоретический интерес, но важна и с практической точки зрения, поскольку пшеница является важнейшей сельскохозяйственной культурой.

Исходя из вышеизложенного, АКТУАЛЬНОСТЬ диссертационной работы Дорониной Татьяны Валерьевны, посвященной изучению структуры антиподальных клеток зародышевого мешка пшеницы на стадиях дифференцировки и программируемой клеточной гибели, не вызывает сомнений.

Структура и содержание диссертационной работы:

Диссертационная работа Дорониной Т.В. построена по стандартному плану и состоит из оглавления, введения, обзора литературы, глав материалы и методы, результаты, обсуждение, заключения, выводов и списка литературы. Во введении диссертант обосновывает актуальность исследования, описывает степень разработанности темы и научную новизну полученных результатов, формулирует цель и задачи диссертационной работы, аргументирует ее научную и практическую значимость.

Глава обзор литературы состоит из нескольких разделов. В первом подробно рассмотрены политетные хромосомы – описаны общие принципы их строения у животных и указаны особенности политетных хромосом в тканях растений. Основные положения этого раздела проиллюстрированы схемами или микрофотографиями, взятыми из литературных источников, а данные по обнаружению политетных хромосом в разных таксономических группах растений суммированы в таблице 1. В качестве замечания можно упомянуть то, что названия некоторых видов написаны с ошибками (например, *Aegilops cylindrica*l, *Ae. longitissima*, *Triticum uraty* – или приведены некорректно (например, *Triticum* var. *farrum* является разновидностью, а точное видовое название *Triticum aestivum*). Данное замечание, однако, носит частный характер.

Второй раздел обзора литературы посвящен описанию особенностей строения и формирования зародышевого мешка злаков. Как и в предыдущем разделе, диссертант, помимо описания, приводит детальные схемы, иллюстрирующие как этапы эмбриогенеза, так и двойного оплодотворения и

развития семени как у модельного растения (арабидопсис), так и изучаемого в диссертации объекта (злаки). Особое внимание автор уделила временной периодизации этих процессов; такая информация необходима при разработке схемы последующих экспериментов. Подробно рассмотрена доступная из литературы информация по антиподальным клеткам злаков, и отмечено, что имеющихся данных недостаточно и они носят фрагментарный характер. Диссертант суммировала информацию о наличии и числе антиподальных клеток у разных видов злаков в таблице 2, но в ней, как и в таблице 1, также изредка встречаются ошибки в написании названий видов или даны устаревшие или нелегитимные названия (например, *Triticum repens*, *Avena flavesrens* и др.). Возможно, такие обозначения видов были использованы авторами процитированных ею работ, однако и в этом случае диссидентанту следовало брать принятые в настоящее время наименования, а исторические указывать в скобках.

В следующем разделе «Обзора литературы» подробно рассмотрена структура антиподального комплекса ряда злаков: кукурузы, риса, тритикале, ячменя и пшеницы. При описании особенностей ультраструктуры антиподальных клеток этих объектов Т.В. Доронина также использовала микрофотографии, взятые из литературных источников. Однако не все подписи к рисункам, особенно рис. 16 – 19, содержали расшифровку всех буквенных сокращений. Наиболее детально автор останавливалась на особенностях антиподальных клеток пшеницы – морфологии составляющих их клеток и происходящих в них изменений на разных этапах после оплодотворения.

В последнем разделе «Обзора литературы» диссидентант анализирует доступную в литературе информацию по особенностям и механизмам программируемой клеточной гибели (ПКГ) растений, проводит сравнение вариантов клеточной гибели животных и растений, описывает особенности вакуолярной клеточной гибели и программируемого некроза, что суммировано на рис. 26. Отдельный раздел посвящен рассмотрению

ферментов и гормонов, задействованных на определенных этапах ПКГ, и отмечен существенный недостаток знаний о молекулярных механизмах этого процесса у растений и его генетическом контроле.

Содержание главы «Обзор литературы» обобщено в разделе «Заключение»; здесь же сформулированы основные задачи работы и их связь с уже известными фактами, обоснованы методы исследования и выбор объекта.

В третьей главе даются материалы и методы исследования. Обращает на себя внимание большой объем проделанной автором работы и использование ею самых современных молекулярно-цитогенетических методов, позволившие получить четкие и достоверные результаты. В разделе детально описаны и подробно проиллюстрирована подготовка и отбор растительного материала на определенных стадиях эмбриогенеза, методы фиксации и приготовления цитологических и гистологических препаратов для световой и электронной микроскопии, FISH, иммуноцитохимического исследования и окраски серебром, оценки уровня экспрессии генов, а также измерений, анализа изображений и статистической обработки. Следует отметить, что в работе встречается разное толкование термина «содержание ДНК». Так, в подразделе 3.2.2. диссертант использует термин «количество ДНК» для обозначения результата определения интенсивности флуоресценции ядер антиподальных клеток по отношению к флуоресценции ядер эндосперма с известным уровнем полидности ($1n=3x=21$)/ содержанием ДНК ($1C=17.3\text{ pg}$, термин взят с сайта Plant DNA C-values Database). Ранее, в главе «Обзор литературы» Т.В.Доронина также описывала этот показатель как полидность (напр., «Полидность может достигать 8192C» (стр. 23)) или уровень/ степень полидности (стр. 24), что, с моей точки зрения, является более корректным.

Четвертая глава диссертации Дорониной Т.В. посвящена изложению результатов исследования. Сначала она анализирует общую структуру комплексов антиподальных клеток на стадиях дифференцировки и клеточной

гибели. Следует отметить, что вся экспериментальная работа по теме диссертации была проведена на большом объеме материала – клетках 153 зародышевых мешков, и на высоком техническом уровне. Приведенные микрофотографии наглядно иллюстрируют структуру антиподальных комплексов на разных стадиях онтогенеза, что позволило автору проследить и подробно описать происходившие в них изменения.

Далее диссидентант изучает особенности структуры и прослеживает изменения ядер антиподальных клеток на стадиях дифференцировки и гибели у неоплодотворенных зародышевых мешков, что ранее никем не изучалось. Полученные автором результаты наглядно показали, что происходящие при этом процессы отличаются от тех, что наблюдались в оплодотворенных зародышевых мешках.

В следующем подразделе рассматривается структура политетенных хромосом антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков. На серии микрофотографий Т.В. Доронина продемонстрировала, что тело политетных хромосом антиподальных клеток образовано параллельно расположенными хроматидами, каждая из которых представлена двумя тонкими переплетающимися фибриллами. В свою очередь хроматиды, переплетаясь между собой, образуют крупные цепочки. Все хроматиды, входящие в состав плеча, в дальнейшем дополнительно спирализуются. С помощью FISH с теломерным повтором диссидентант показала, что теломерные участки политетных хромосом содержат многочисленные сигналы, которые на стадии ранней дифференцировки локализуются вблизи друг друга, а на поздней стадии сигналы выявлялись в концах плеч обособленных политетных хромосом.

Автором установлено, что ядра антиподальных клеток на стадиях дифференцировки содержат от 1 до 4 крупных ядрышек (соответствуют двум парам спутниковых хромосом) и несколько мини-ядрышек. На стадии гибели происходит сегрегация отдельных компонентов ядрышка и их встраивание в тела политетных хромосом. Т.В. Доронина установила, что

перераспределение материала ядрышка в ходе ПКГ происходит во всех ядрах клеток антиподального комплекса. В ядрах клеток антипод неоплодотворенного зародышевого мешка сегрегации компонентов ядрышка на стадии гибели обнаружено не было. С использованием метода TUNEL диссертант доказала, что на стадии гибели антиподальных клеток оплодотворенных зародышевых мешков деградация ДНК происходит путем 3'-концевых разрывов, которые изначально могут затрагивать лишь часть хромосом или только определенные районы ядра, но на поздних стадиях визуализируются уже во всем объеме хроматина. 3'-концевые разрывы ДНК отмечены и в антиподальных ядрах неоплодотворенных зародышевых мешков, которые в разных клетках также распределяются не одинаково.

С помощью электронной микроскопии было установлено, что ультраструктура основных компонентов антиподальных ядер меняется в течение всех стадий дифференцировки и гибели клеток, а обнаруженные изменения подробно описана в диссертационной работе. В этом разделе также хочется отметить высокое качество иллюстративного материала.

Измерение содержания ДНК показало, что в пределах одного антиподального комплекса ядра отличаются по уровню пloidности, полученные величины описаны в соответствующих разделах и обобщены на ряде графиков (рис. 82-84). Сходная вариативность была выявлена диссидентом и по площади ядер в клетках антиподального комплекса. Следует указать, однако, что название раздела 4.3.2. «Площадь ДНК ядер...» терминологически неправильно, т.к. ДНК не может иметь площади.

Далее автор определяет, на какой стадии происходит обособление политетинных хромосом в ядрах антиподальных клеток разных ярусов в ходе дифференцировки и ПКГ оплодотворенного зародышевого мешка. Согласно полученным ей результатам, в апикальном ярусе процесс начинается на стадии средней дифференцировки, а объединение хромосомных территорий начинается на средней стадии ПКГ комплекса. В ходе дифференцировки и гибели отмечены также изменения формы ядер от круглых на ранней и

средней стадиях дифференцировки через овальные на поздней стадии дифференцировки до вытянутых на поздних стадиях гибели. Изменения размеров и формы ядер с указанием уровня их полидности в клетках разных ярусов антиподального комплекса на разных стадиях дифференцировки и гибели описаны достаточно подробно и проиллюстрированы серией микрофотографий (рис. 90-94). Из недочетов этой части работы можно указать, что подпись к рисунку 92, по-видимому, содержит ошибку в определении стадии (средняя вместо поздней).

Анализ структуры органелл цитоплазмы антиподальных клеток на разных стадиях дифференцировки и гибели с использованием методов световой микроскопии позволил установить, что клеточная гибель на финальных этапах гибели комплекса оплодотворенных зародышевых мешков сопровождается разрушением митохондрий и выходом цитохрома с в цитоплазму, тогда как в неоплодотворенных зародышевых мешках этого не наблюдается. Методом количественной ПЦР было показано возрастание уровня экспрессии двух генов – *Cytochrome p450* и гена теплового шока *Hsp70* в антиподальных клетках относительно клеток зародышевого мешка. Автор делает вывод, что митохондрии принимают участие в ПКГ оплодотворенных зародышевых мешков и это сопровождается выходом цитохрома с в цитоплазму. Применение электронной микроскопии позволило охарактеризовать тонкую структуру клеток антиподального комплекса и выявить изменения распределения органелл в процессе дифференцировки и гибели. Диссертантом проведена точная периодизация развития антиподальных клеток пшеницы относительно времени опыления материнского растения, что может быть очень полезным для дальнейших исследований в этой области.

В главе «Обсуждение» диссертант анализирует полученные ей результаты с учетом имеющихся в литературе публикаций. На основании собственных наблюдений она предлагает детальные схемы структурных преобразований клеток и ядер антиподального комплекса оплодотворенных и

неоплодотворенных зародышевых мешков в ходе дифференцировки и гибели, а также формулирует гипотезу о функциональном значении антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы. Следует отметить, что многие результаты, полученные автором диссертационной работы, являются принципиально новыми и не имеют аналогов в мировой литературе.

Заключение представляет собой краткое резюме диссертационной работы, основные положения которой суммированы в 4 выводах. В конце диссертации приводится список литературы, включающий 190 источников, из них 32 – на русском языке.

Результаты диссертации Т.В. Дорониной могут быть использованы в научно-исследовательских лабораториях, специализирующихся в области клеточной биологии и генетики, при чтении лекций и проведении спецкурсов в научно-образовательных учреждениях, в том числе на кафедрах клеточной биологии и генетики МГУ, НГУ и СПГУ, ТСХА и других.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения диссертационной работы Т.В.Дорониной опубликованы в 4 печатных работах, в том числе 4 статьях в журналах, рекомендованных для защиты в МГУ. Результаты работы были представлены на 16 российских и международных научных конференциях. Содержание диссертации достаточно полно отражено в автореферате.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

Диссертация Т.В. Дорониной написана хорошим литературным языком, содержит 127 рисунков, представляющих схемы и микрофотографии. При прочтении рукописи было обнаружено лишь небольшое количество ошибок и опечаток, приведенных в соответствующих разделах отзыва.

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. 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,
Ведущий научный сотрудник лаборатории
генетических основ идентификации растений
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Институт общей генетики
им. Н.И. Вавилова РАН»

Бадаева Екатерина Дмитриевна

23 марта 2023 г.

Контактные данные:

тел.: _____, e-mail: _____

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.03 – молекулярная биология и
03.02.07 – генетика

Адрес места работы:

119333, г. Москва, ул. Губкина, д. 3
Институт общей генетики им.Н.И. Вавилова РАН,
лаборатория генетических основ идентификации растений.
Тел.: 7(499) 1350460; e-mail: katerinabadaeva@gmail.com

Подпись сотрудника ИОГен РАН Бадаевой Е.Д.
удостоверяю:

Ученый секретарь ИОГен РАН

И.И. Горячева

«23» марта 2023 г.

