

Заключение экспертной комиссии диссертационного совета 24.1.218.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

от 25.10.2023 (двадцать пятого октября две тысячи двадцать третьего года)

(протокол № 20)

по принятию к защите диссертационной работы Алексева Валентина Юрьевича на тему «Роль эндофитных микроорганизмов рода *Bacillus*, синтезирующих метаболиты с инсектицидными свойствами, в устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки).

Председатель комиссии: д-р биол. наук, проф., Мелентьев А.И.

Члены комиссии:

д-р биол. наук, с.н.с. Высоцкая Л.Б.

д-р биол. наук, доцент Баймиев Ан.Х.

Комиссия диссертационного совета 24.1.218.01 рассмотрела документы диссертационной работы о принятии к защите диссертации младшего научного сотрудника лаборатории молекулярной фармакологии и иммунологии Института биохимии и генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН) Алексева Валентина Юрьевича «Роль эндофитных микроорганизмов рода *Bacillus* Cohn, синтезирующих метаболиты с инсектицидными свойствами, в устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки).

Научный руководитель: Веселова Светлана Викторовна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биохимии иммунитета растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (УФИЦ РАН).

Комиссия пришла к следующему заключению:

1. Актуальность темы

В настоящее время в научной литературе растения рассматривают как сложный холобионт – совокупность хозяина и других организмов, живущих в фитосфере и взаимодействующих между собой и растением сложным образом. Микроорганизмы, входящие в филлосферу,

эндосферу и ризосферу растений составляют микробиом растения и являются частью сложного холобионта. Многочисленные полезные микроорганизмы микробиома привлекают огромное внимание ученых из-за их роли в жизни растений. Полезный микробиом или стимулирующие рост растений микроорганизмы не только усиливают рост растений за счет улучшения доступности питательных веществ, но обеспечивают устойчивость к биотическим и абиотическим стрессовым факторам. Особое место среди полезного микробиома растений занимают эндофитные микроорганизмы, к которым относятся бактерии и грибы, способные колонизировать растения и жить в их внутренних частях, не нанося при этом видимого ущерба хозяину.

У многих сельскохозяйственных культур описано разнообразие бактериальных эндофитов, в котором наиболее представлены бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Enterobacter* и др. В настоящее время применение эндофитных микроорганизмов считается одним из наиболее безопасных и перспективных подходов для защиты растений от патогенов и вредителей и контроля до- и послеуборочных потерь сельскохозяйственной продукции. Эндофиты могут служить продуцентами метаболитов, которые могут помочь в методах биоконтроля или в более эффективном ведении сельского хозяйства. В течение последних двух десятилетий различные виды микроорганизмов, в том числе бактерии и грибы, были охарактеризованы и использованы в качестве биологических препаратов или агентов биоконтроля. В том числе во всем мире значительно увеличилось распространение коммерческих препаратов на основе бактерий рода *Bacillus*.

К сожалению, в настоящее время против насекомых-вредителей, питающихся флоэмным соком (тли, белокрылки и цикадки) имеется ограниченное количество биологических препаратов, и борьба с этими вредителями сводится к применению химических системных инсектицидов, загрязняющих окружающую среду. Актуальной задачей является поиск новых перспективных штаммов эндофитных бактерий и изучение механизмов их действия при развитии иммунитета против вредителей. Данная работа посвящена изучению роли бактерий рода *Bacillus* в развитии защитных реакций в растениях пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* Rond..

Обыкновенная злаковая тля *S. graminum* наносит значительный ущерб посевам пшеницы, так как воздействие тлей на растение обусловлено снижением скорости фотосинтеза и, как следствие, скорости роста растения при изъятии флоэмного сока во время питания тлей. Применение биопрепаратов на основе эндофитных бактерий, способных долговременно защищать растения от вредителей, будет способствовать отказу от использования химических инсектицидов, и гарантировать получение экологически чистой продукции, свободной от различных канцерогенов.

Взаимодействия растений и эндофитов изучаются уже много лет, однако механизмы, используемые эндофитными бактериями для смягчения негативного воздействия различных факторов окружающей среды на растения, остаются неясными. В настоящее время полагают, что полезные свойства бактериальных эндофитов реализуются через прямые и опосредованные защитные механизмы за счет секреции широкого спектра различных метаболитов. Прямые механизмы защиты растений эндофитами реализуются в основном за счет секреции метаболитов, обладающих биоцидной активностью (преимущественно антимикробных пептидов – циклических липопептидов, сидерофоров, гидролитических ферментов и др.). Опосредованные механизмы связаны с конкуренцией с патогенами за пространство и питательные вещества, а также со способностью эндофитов стимулировать рост и регулировать работу иммунного ответа растений за счет секреции фитогормонов, липополисахаридов, липопептидов, летучих органических соединений и др. Бактериальные метаболиты являются действующим началом любого биопрепарата. Уже более 80 лет дельта-эндотоксины (Cry и Cyt) бактерий *Bacillus thuringiensis* (Bth-токсины) используют в прямых механизмах защиты как эффективные регуляторы численности насекомых. Актуальной задачей на сегодняшний день остается повышение эффективности Bth-токсинов против вредителей из отряда Hemiptera, которую можно решить с помощью поиска и использования эндофитных штаммов *B. thuringiensis*, экспрессирующих афицидные Bth-токсины. Инсектицидность, в том числе афицидность, других бактериальных метаболитов – липопептидов была установлена относительно недавно. Однако возможно, что липопептиды играют и элситорную роль в запуске защитных сигнальных путей у растений, но этот вопрос пока остается практически не исследованным. Непрямые механизмы защиты связаны с активацией иммунной системы растений, которая осуществляется путем стимуляции защитных сил посредством системной индуцированной устойчивости (СИУ). В настоящее время в научной литературе СИУ, опосредованная бактериями, определяется как «прайминг». Прайминг-защита — это стратегия, позволяющая проявить более быструю защитную реакцию при нападении вредного организма и продлить эту реакцию на весь вегетационный период и даже передать по наследству. Защитные ответы, индуцированные бактериальными эндофитами, включают различные стратегии защиты и используют различные механизмы, которые могут включать накопление защитных PR-белков, различных ферментов, влияние на редокс-метаболизм и генерацию активных форм кислорода, а также синтез вторичных метаболитов. Известно, что прайминг с помощью бактерий обеспечивает исключительную защиту растений с низкими физиологическими затратами, что привлекает большое внимание исследователей. В настоящее время механизмы взаимодействия растений и эндофитов при развитии

прайминга продолжают активно изучаться. Однако в этой новой области исследований остаются нерешенные вопросы, в том числе вопрос о сочетании стимулирования роста растений с защитными механизмами, которые индуцируются бактериальными эндофитами.

2. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Определение темы диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научным руководителем к.б.н. Веселовой С.В. Разработка методологических подходов к решению поставленных задач, непосредственное проведение экспериментов по исследованию биологической активности соединений, а также анализ и обсуждение полученных результатов и их оформление в виде научных публикаций и докладов проведены автором лично, либо при непосредственном участии. Подготовка рукописи настоящей диссертационной работы и автореферата лично проводились автором.

3. Достоверность результатов проведенных исследований

Результаты исследования достоверны. Выводы адекватны используемым методам и соответствуют поставленным задачам. Научные положения и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

Результаты работы представлены на российских и международных научных конференциях, в том числе в виде устных и стендовых докладов на VI и VII Всероссийской конференции с международным участием «Экобиотех» 2019, 2021 (Уфа, 2019, 2021); The 6th and 7th International Scientific Conference «PlantGen2021» (Новосибирск, 2021), «PlantGen2023» (Казань, 2023); VII Всероссийской научно-практической конференции «Биологические и технологические основы селекции, семеноводства, размножения и защиты сельскохозяйственных и лесных древесных растений» (Ялта, 2021); V (XIII) Международной ботанической конференции молодых учёных в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2022).

4. Научная новизна и практическая значимость

Впервые изучена роль эндофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* из коллекции ИБГ УФИЦ РАН и их липопептидов в индукции неспецифических защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*. Впервые показано, что прямой афицидный эффект эндофитных штаммов бактерий *Bacillus* spp. по отношению к обыкновенной злаковой тле обусловлен бактериальными липопептидами, а именно сурфактином, итурином и фенгицином. Впервые показано влияние липопептид-богатых фракций (ЛБФ) штаммов бактерий *Bacillus* spp. на различные типы устойчивости (антибиоз, выносливость) растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*, на индукцию защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*, включающих в себя изменения в состоянии про-/антиоксидантной системы и экспрессии

генов защитных белков растений пшеницы, ответственных за формирование системной устойчивости. С использованием рекомбинантной линии *Bacillus subtilis* 26DSfp- с подавленным синтезом сурфактина доказана роль этого липопептида в афицидности бактериального штамма и в запуске СИУ. Сформулированы принципы создания комплексных биопрепаратов на основе композиций бактериальных штаммов, такие как активность метаболитов; антагонизм штаммов по отношению друг к другу; эндофитность индивидуально и в композиции; рост-стимулирование и иммуномодуляция; индукция различных гормональных сигнальных путей. Результаты работы показали, что при составлении бактериальных композиций важна как концентрация каждого штамма бактерий при обработке, так и соотношение между штаммами в смеси. Выявлены аддитивные эффекты бактериальных композиций по всем показателям – афицидность, антибиоз, толерантность, а главное индукция СИУ, что приводило к повышенной устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*. В композиции штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ доказана роль липопептидов сурфактина и итурина в развитии аддитивного эффекта смеси.

Совокупность полученных данных позволяет расширить современные представления о физиологических и биохимических механизмах устойчивости растений к злаковой тле. Изученные бактериальные штаммы и изоляты рода *Bacillus* могут быть рекомендованы в качестве компонентов биопрепаратов для эффективной биологической борьбы со злаковой тлей *S. graminum* Rond. на посевах пшеницы. Основные результаты работы могут быть использованы в учебно-исследовательской работе.

5. Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 7 статей в журналах, из них 4 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах данных.

Научные статьи:

1. Maksimov I.V. Recombinant *Bacillus subtilis* 26DCryChS line with gene Btcry1Ia encoding Cry1Ia toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes integrated wheat defense against pathogen *Stagonospora nodorum* Berk. and greenbug *Schizaphis graminum* Rond. / I.V. Maksimov, D.K. Blagova, S.V. Veselova, A.V. Sorokan, G.F. Burkhanova, E.A.Cherepanova, E.R. Sarvarova, S.D. Rumyantsev, V.Yu. Alekseev, R.M. Khayrullin // Biological Control. 2020. V. 144. 104242. doi: 10.1016/j.biocontrol.2020.104242 (Wos Q1, IF 3.857)
2. Sorokan A. Endophytic *Bacillus* spp. as a Prospective Biological Tool for Control of Viral Diseases and Non-vector *Leptinotarsa decemlineata* Say. in *Solanum tuberosum* L. / A.

- Sorokan, E. Cherepanova, G. Burkhanova, S. Veselova, S. Rumyantsev, V. Alekseev, I. Mardanshin, E. Sarvarova, R. Khairullin, G. Benkovskaya and I. Maksimov // *Front. Microbiol.* 2020. 11:569457. doi: 10.3389/fmicb.2020.569457 (Wos Q1, IF 6.064)
3. Veselova V. By modulating the hormonal balance and ribonuclease activity of tomato plants *Bacillus subtilis* induces defense response against Potato Virus X and Potato Virus Y / V. Veselova, A. Sorokan, G. Burkhanova, S. Rumyantsev, E. Cherepanova, V. Alekseev, E. Sarvarova, A. Kasimova, I. Maksimov // *Biomolecules.* 2022. V. 12(2). P. 288. doi: 10.3390/biom12020288. (WOS Q2, Scopus Q1. IF 6.064)
 4. Rumyantsev S.D. Additive effect of the composition of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* on systemic resistance of wheat against greenbug aphid *Schizaphis graminum* due to lipopeptides / S.D. Rumyantsev, V.Y. Alekseev, A.V. Sorokan, G.F. Burkhanova, E.A. Cherepanova, R.R. Garafutdinov, I.V. Maksimov, S.V. Veselova // *Life.* 2023. V. 13. 214. doi: 10.3390/life13010214. (BAK, WOS Q2. IF 3.253)
 5. Алексеев В.Ю. Афицидная и иммуностимулирующая активность бактериальных липопептидов продуцируемых штаммами *Bacillus subtilis* / В.Ю. Алексеев, С.Д. Румянцев, С.В. Веселова, Е.А. Черепанова, И.В. Максимов // *Труды Кубанского Государственного аграрного университета.* 2021. В. 6. №. 93. С. 169-173. doi: 10.21515/1999-1703-93-168-173. (BAK, RSCI)
 6. Веселова С.В. Бактерии рода *Bacillus* как перспективный источник для создания биопрепаратов от патогенов и вредителей сельскохозяйственных культур / С.В. Веселова, А.В. Сорокань, Г.Ф. Бурханова, С.Д. Румянцев, В.Ю. Алексеев, Е.А. Черепанова, И.В. Максимов // *Труды Кубанского Государственного аграрного университета.* 2022. Выпуск 4. №97. С. 40-45. DOI: 10.21515/1999-1703-97-40-45. (BAK, RSCI)
 7. Румянцев С.Д. Роль эндофитных бактерий рода *Bacillus* в регуляции экспрессии генов транскрипционных факторов, вовлеченных в защитный ответ пшеницы против тли *Schizaphis graminum* (rond.) / С.Д. Румянцев, В.Ю. Алексеев, С.В. Веселова, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов // *Труды Кубанского Государственного аграрного университета.* 2022. В. 4. №. 97. С. 124-130. DOI: 10.21515/1999-1703-97-124-130. (BAK, RSCI)

6. Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертационная работа «Роль эндофитных микроорганизмов рода *Bacillus*, синтезирующих метаболиты с инсектицидными свойствами, в устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*» соответствует паспорту научной специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки), охватывающих

биохимические/метаболические/энергетические процессы в тканях и органах организма в норме и при патологиях, а так же экологическую биохимию, механизмы адаптации к окружающей среде.

7. Ценность научных работ соискателя.

Совокупность полученных новых данных позволяет расширить современные представления о роли бактериальных метаболитов с инсектицидными свойствами (Сгу-белков и ЛП) в индукции физиологических и биохимических механизмов устойчивости растений к злаковой тле. Основные результаты работы могут быть использованы в учебно-исследовательской работе. Практическая значимость работы заключается в формировании принципов создания комплексных биопрепаратов на основе композиций бактериальных штаммов, в которых раскрывается важность спектра синтезируемых метаболитов; антагонизма штаммов по отношению друг к другу; эндофитности бактерий индивидуально и в композиции; ростстимулирования и иммуномодуляции; индукции СИУ по различным гормональным сигнальным путям. Изученные бактериальные штаммы и изоляты рода *Bacillus* могут быть рекомендованы в качестве компонентов биопрепаратов для эффективной биологической борьбы со злаковой тлей *S. graminum* Rond. на посевах пшеницы.

8. Научная зрелость соискателя

Алексеев В.Ю. выполнил большой объём экспериментальной и теоретической работы по изучению роли эндофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* из коллекции ИБГ УФИЦ РАН и их липопептидов в индукции неспецифических защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*. При непосредственном участии Алексеева В.Ю. были выполнены все этапы экспериментальных исследований, а также обработка, анализ, и, что немаловажно, оформление полученных результатов в виде рукописей, опубликованных в высокорейтинговых научных изданиях. Алексеев В.Ю. показал себя как высококвалифицированный, грамотный и ответственный исследователь, имеющий высокий уровень профессиональной подготовки и обладающий всеми необходимыми знаниями и навыками, присущими специалистам в области биохимии.

9. Проверка диссертации на заимствованного материала без ссылки на авторов.

В тексте диссертации соискатель ссылается на авторов и источники заимствования материалов и отдельных результатов, также отмечает полученные лично и (или) в соавторстве результаты, что соответствует п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842. Итоговая оценка оригинальности по системе проверки

использования заимствованного материала без ссылки на автора составила 79.65% (заключение экспертной комиссии и автоматический отчет прилагаются).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспертная комиссия единогласно решила, что диссертационная работа Алексева Валентина Юрьевича «Роль эндофитных микроорганизмов рода *Bacillus*, синтезирующих метаболиты с инсектицидными свойствами, в устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки) представляет собой научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям п.9-11,13,14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, в диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, отмечено отсутствие в диссертации заимствованного материала без ссылок на авторов или источники заимствования. Диссертационная работа Алексева Валентина Юрьевича «Роль эндофитных микроорганизмов рода *Bacillus*, синтезирующих метаболиты с инсектицидными свойствами, в устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*» может быть рекомендована к официальной защите на Диссертационном совете 24.1.218.01, по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки).

Экспертная комиссия диссертационного совета 24.1.218.01 единогласно решила:

Рекомендовать представляемую диссертацию Алексева Валентина Юрьевича к официальной защите на Диссертационном совете 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки).

Утвердить официальных оппонентов, обратив внимание на их научные публикации:

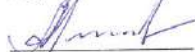
Финкину Екатерину Ивановну – кандидата химических наук, старшего научного сотрудника отдела «Учебно-научный центр» Государственного научного центра Федерального государственного бюджетного учреждения науки института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, (117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), тел.: +7(495) 335-01-00, факс: +7 (495) 335-08-12 e-mail: office@ibch.ru, сайт: <https://www.ibch.ru/>

Белимова Андрея Алексеевича – доктора биологических наук, главного научного сотрудника Федерального государственного бюджетного научного учреждения Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии, (шоссе Подбельского, д. 3, Пушкин-8, г. Санкт-Петербург, 196608), тел.: +7 (812) 470-51-00, Факс: +7 (812) 470-43-62, e-mail: arriam2008@yandex.ru, сайт: <https://www.arriam.ru/>.

Утвердить ведущую организацию, обратив внимание на то, что одно из основных направлений научно-исследовательской деятельности структурного подразделения, где будет проходить обсуждение, соответствует тематике диссертации соискателя: Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ФИЦ СЦ РАН), 410028, Российская Федерация, Саратов, улица Рабочая, 24, тел.: (845-2) 27-14-36, e-mail: sncransar@san.ru, сайт: <http://снцран.рф/>, И.о. директора, д.т.н., профессор Кушников Вадим Алексеевич.

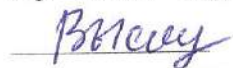
Председатель экспертной комиссии Диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук:

д-р биол. наук, проф., Мелентьев А.И. (по специальности 1.5.4. Биохимия)



Члены комиссии:

д-р биол. наук, с.н.с. Высоцкая Л.Б. (по специальности 1.5.4. Биохимия)

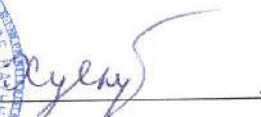


д-р биол. наук, проф. Баймиев Ан.Х. (по специальности 1.5.3. Молекулярная биология)



Председатель диссертационного совета 24.1.218.01
д.б.н., проф. член корр. РАО Хуснутдинова Э. К.





Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.218.01
д.б.н., доцент Корыгина Г. Ф.



Дата: 25.10.2023 (Двадцать пятое октября две тысячи двадцать третьего года)