

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук

Белимова Андрея Алексеевича

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

Актуальность темы исследования

Обыкновенная злаковая тля *Schizaphis graminum* относится к отряду полужесткокрылых (Hemiptera), имеет колюще-сосущий ротовой аппарат и является вредителем зерновых культур. Вредоносность злаковых тлей на зерновых культурах проявляется в снижении скорости фотосинтеза и задержке роста растений при питании насекомых флоэмным соком, что влияет на урожайность. Особенности строения ротового аппарата и питания тлей составляют основную сложность в борьбе с этими насекомыми. Поэтому актуальной задачей является поиск новых безопасных средств защиты от насекомых с колюще-сосущим ротовым аппаратом. В настоящее время все большую популярность, в качестве компонентов биопрепаратов, приобретают эндофитные стимулирующие рост растений бактерии (СРРБ), живущие внутри растения-хозяина, повышающие урожайность и устойчивость растений по отношению к вредителям и при этом не загрязняющие окружающую среду. В настоящее время полагают, что полезные свойства бактериальных эндофитов реализуются через прямые и опосредованные защитные механизмы за счет секреции широкого спектра различных метаболитов. Однако механизмы, используемые эндофитными бактериями для смягчения негативного воздействия факторов окружающей среды на растения, остаются неясными.

В связи с этим, тема диссертационной работы В.Ю. Алексева является весьма актуальной, а идея проанализировать роль и взаимодействие метаболитов эндофитных бактерий рода *Bacillus*, обладающих инсектицидными свойствами, в индукции устойчивости пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum* является новаторской и представляет научно-практический интерес. Для достижения поставленной в работе цели автор должен был оценить роль и взаимодействия метаболитов эндофитных бактерий рода *Bacillus* в индукции неспецифических защитных реакций выбранного вида пшеницы (*Triticum aestivum*) сорта Салават Юлаев к обыкновенной злаковой тле, связанных с изменениями в редокс-статусе и экспрессии генов патоген-индуцируемых белков у растений. Выбор вида и сорта пшеницы автор объясняет тем, что это одна из основных возделываемых культур в Республике Башкортостан. Задачи сформулированы корректно и отражают многоплановость изучения проблемы: на уровне характеристики самих

бактерий, их метаболитов, взаимодействия бактерий с вредителем и наконец, тройного взаимодействия растения – бактерии – вредитель.

Научная новизна исследования

Новизна исследований и результатов очевидна, так как впервые изучена роль липопептидов эндофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* из коллекции ИБГ УФИЦ РАН в индукции неспецифических защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*. Впервые показано, что существенную роль в прямой афицидный эффект эндофитных штаммов *Bacillus* spp. по отношению к обыкновенной злаковой тле вносили бактериальные липопептиды – сурфактин, итурин и фенгицин. Впервые показано влияние липопептид-богатых фракций штаммов бактерий *Bacillus* spp. на различные типы устойчивости (антибиоз, выносливость) пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum* и на индукцию защитных реакций растений.

С использованием рекомбинантной линии *B. subtilis* 26ДС_{sp}⁻ с подавленным синтезом сурфактина доказана роль этого липопептида в афицидности бактериального штамма и в запуске системной индуцированной устойчивости у растений. Впервые показано, что выявленные аддитивные эффекты бактериальных композиций в афицидности, антибиозе, выносливости и индукции системной индуцированной устойчивости, приводили 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 аддитивном эффекте смеси.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы

Результаты, полученные в ходе проведения данного исследования, позволяют расширить современные представления о роли бактериальных метаболитов с инсектицидными свойствами в индукции физиологических и биохимических механизмов устойчивости растений к злаковой тле. Благодаря проведенным исследованиям были сформулированы принципы создания композиций бактериальных штаммов, в которых раскрывается важность спектра синтезируемых метаболитов и других показателей, что, несомненно, имеет большое практическое значение. Практический интерес представляют подобранные композиции бактериальных штаммов

Обоснованность и достоверность результатов

Диссертационная работа Алексева В.Ю. проведена на достаточно высоком методическом уровне. Высокая степень достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационной работы обусловлена выполнением экспериментов на репрезентативных выборках, применением современных методов экспериментальной биологии с использованием биохимических, молекулярно-биологических и микробиологических технологий и статистического анализа, что полностью соответствует поставленной цели и задачам исследования.

Структура и содержание диссертационной работы

Рукопись диссертационной работы изложена на 230 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и

методов проведения исследований, главы с изложением экспериментальных данных, заключения, выводов и списка цитированной литературы, насчитывающего 247 наименований.

Во введении подробно рассматривается актуальность работы, указаны цель и задачи исследований, научная новизна и практическая значимость работы, выносимые на защиту положения, методы исследований, личный вклад соискателя, степень достоверности и апробация работы.

Представленный в диссертации «Обзор литературы» полностью отражает современный уровень изучаемых диссертантом вопросов. Соискатель показал очень хорошее знание отечественной и зарубежной литературы, последовательно и логично излагал материал. Представленный в этой главе материал свидетельствует о высоком уровне научной эрудиции автора, четком понимании задач исследований и путей их решения. Важно заметить, что 32 % проанализированных источников опубликовано после 2019 года.

В главе «Материалы и методы» представлены сведения об объектах исследований, методиках проведения лабораторных испытаний, статистической обработке данных. Используемые автором методики охарактеризованы достаточно полно и не вызывают возражений.

Глава «Результаты и обсуждение» разделена на подразделы, в которых диссертант подробно и последовательно объясняет ход исследования и раскрывает поставленные исследовательские задачи. Результаты изложены четко, хорошо иллюстрированы рисунками и таблицами и активно обсуждаются автором. В первом подразделе описываются исследования различных свойств бактерий, таких как способность, колонизировать внутренние ткани растений и синтезировать различные метаболиты. Стоит отметить, что изучение метаболической активности бактерий было проведено как на генетическом, так и на метаболическом уровнях. Большое внимание в работе было уделено составлению бактериальных композиций. Во втором подразделе автор описывает изучение прямого воздействия бактерий на вредителя и роли в этом процессе бактериальных метаболитов. Эти результаты являются базисом для последующего усложнения рассматриваемой автором биосистемы. В третьем подразделе описывается характер тройного взаимодействия между растениями, бактериями и вредителем. В этом подразделе автор анализирует влияние тройного взаимодействия с одной стороны на растение, с другой стороны на жизнеспособность вредителя. Затем автор анализирует влияние бактерий и их метаболитов на процессы, сопровождающие индукцию системного ответа растения на вредителя и связанные с изменениями в редокс-статусе и экспрессии генов патоген-индуцируемых белков у растений. Сначала ракурс видения сложной системы в динамике акцентируется на влиянии отдельных бактериальных штаммов и отдельных метаболитов, затем смещается в сторону композиций бактерий или метаболитов. Именно благодаря тщательно продуманной методологии поставленных экспериментов автор может интерпретировать каждый ответный

шаг рассматриваемой сложной биосистемы трех организмов и обосновывать выводы, сформулированные по результатам анализа.

В заключении диссертант обобщает результаты выполненных исследований, предлагая принципы составления бактериальных композиций, а также указывает на перспективы практического использования результатов.

Выводы, сделанные диссертантом на основании экспериментальных данных вытекают из представленных в экспериментальной главе материалов, достоверны, новы, не вызывают сомнений.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

Работа Алексеева В.Ю. достаточно хорошо апробирована. Она доложена на ряде российских и международных конференций, по ее материалам опубликовано 15 работ, в том числе 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, из них 4 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах данных. О высоком уровне проведения исследований свидетельствует победа автора в конкурсе РФФИ-аспиранты по теме диссертационной работы, а также участие в выполнении проектов РФФИ и МК.

Общие вопросы и замечания по работе

Принципиальных замечаний к материалам, изложенным в диссертации и в автореферате нет. Однако имеются несущественные замечания и вопросы к автору работы:

1. Страница 8, строки 1-4: Автор пишет, что «Опосредованные механизмы (механизмы защиты растений эндофитами) связаны с конкуренцией с патогенами за пространство и питательные вещества, а также...». Это утверждение было бы уместно пояснить и дать примеры из литературы. Противоречие в том, что одними из негативных действий патогенов как раз является использование пространства и питательных элементов внутри растений. Какова же роль эндофитов в этой конкуренции? Вероятно, что такие механизмы биоконтроля более подходят для ризосферных микроорганизмов, действующих вне растения, а не для эндофитов. На странице 70 есть повтор этих рассуждений.
2. Страница 9: Непонятно, в чём отличие штаммов от изолятов?
3. Страница 52, последняя строка: нет информации о форме движения бактерий «подергивание». Что это такое?
4. Обзор литературы очень подробный и глубокий, что с одной стороны правильно и производит приятное впечатление. Но, с другой стороны, имеются небольшие повторы, избегание которых могло бы сделать эту главу более сжатой и простой для восприятия. Например, информация о Vth-токсинах подробно дана на страницах 56-65, но потом опять повторяется на странице 72. Раздел «Бактериальные препараты» (стр. 83-85) изложен слишком подробно, хотя представленная работа напрямую не связана с разработкой биопрепаратов.
5. Страница 89, раздел «Бактериальная обработка»: проверяли ли стерильность обработанных перекисью водорода семян? Содержали ли обработанные семена эндофитные бактерии?

6. Страница 93, строка 4: Ссылка на экспериментальную статью автора (Rumyantsev et al., 2023) в данном случае представляется не корректной. Нужно было дать ссылку на источник, в котором описан метод расчета доверительных интервалов по стандартным ошибкам. На странице 106 эта информация повторяется, но ссылка на источник не дана.
7. Страница 138: Неправильно обозначены части рисунка 3.8.: на рисунке они обозначены буквами А, В и С, а в подписи к рисунку – А, Б и В.
8. Страница 141: В таблице 3.10 уместно было представить данные по афицидности не только композиций, но и единичных бактериальных штаммов. Это позволило бы оценить эффективность использования именно их композиций.
9. Страница 145: Некорректно сформулировано название главы 3.3: «Роль эндофитных бактерий *Bacillus* spp., ЛБФ и их смесей на два типа устойчивости растений к *S. graminum* – антибиоз и выносливость». Вероятно, пропущено слово.
10. Страница 153: В Таблице 3.14 целесообразно было указать концентрацию суспензий бактерий, а не её количество.
11. Страница 189: Автором «сформулированы принципы создания комплексных биопрепаратов на основе смеси бактериальных штаммов». Однако эти принципы не относятся к созданию самих препаратов. Я имею в виду технологические и производственные принципы, которые в работе не изучались. На мой взгляд, для данной работы более подходит формулировка типа «... обоснование подбора композиции (консорциума) штаммов для последующего создания комплексных биопрепаратов...». Это замечание относится также к выводу №7.
12. Страница 192: Вывод № 5: Словосочетание «играли важную роль во влиянии» очень неконкретно. Желательно было указать, какую именно роль играли эти факторы.
13. Страница 192: Вывод № 7: Целесообразно было выделить информацию об аддитивных эффектах в отдельный самостоятельный вывод.

Автореферат и опубликованные работы отражают основное содержание диссертации.

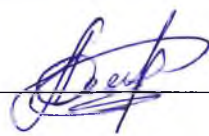
Следует отметить, что указанные замечания не имеют принципиального характера и не влияют на общую высокую оценку работы, которую следует оценить как выполненную на высоком методическом уровне научно-квалификационную работу, а ее автора охарактеризовать как высококвалифицированного специалиста в области биохимии, владеющего современными методами исследований и способного к самостоятельному решению актуальных научных задач. Работа носит законченный характер, а выводы автора убедительны.

Заключение

По степени актуальности темы, уровню полученных научных результатов, степени их новизны, теоретической и практической значимости, а так же форме и содержанию диссертационная работа Алексеева Валентина Юрьевича «Роль эндофитных микроорганизмов рода *Bacillus*, синтезирующих метаболиты с инсектицидными свойствами, в устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*» отвечает всем требованиям п. 9-11, 13, 14, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Алексеев В.Ю., несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия (биологические науки).

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории ризосферной микрофлоры №1 Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»

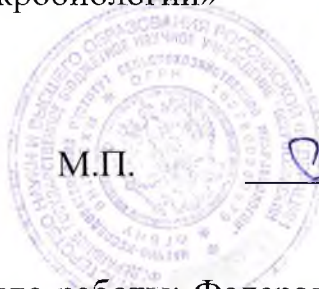


Белимов Андрей Алексеевич

(20.12.2023).

Подпись Белимова Андрея Алексеевича заверяю:

начальник отдела кадров Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»



М.П.



Ковалевская М.А.

(гербовая печать)

Данные оппонента: Место работы: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (ВНИИСХМ), адрес: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3.

Должность: главный научный сотрудник лаборатории ризосферной микрофлоры №1

Телефон организации: +7 (812) 470-51-00

Сайт организации: <https://www.arriam.ru/>

E-mail оппонента: belimov@rambler.ru

Согласен на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных при работе диссертационного совета 24.1.218.01 по диссертационной работе Алексеева 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).

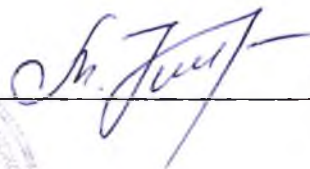
Белимов Андрей Алексеевич



Белимов Андрей Алексеевич

Дата (20.12.2023).

Подпись Белимова Андрея Алексеевича заверяю:
начальник отдела кадров Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»



Ковалевская М.А.