

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата химических наук Финкиной Екатерины Ивановны на диссертационную работу Алексеева 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

Диссертационная работа Алексеева В.Ю. была выполнена в Институте биохимии и генетики – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Известно, что основные потери урожая в сельском хозяйстве обусловлены инфекционными заболеваниями растений, прежде всего грибковой природы, а также действием насекомых-вредителей. Традиционно применяемые фунгициды и инсектициды наносят огромный вред экологии, а отсроченные последствия использования трансгенных растений все еще мало изучены. В настоящее время перспективным и безопасным направлением является использование препаратов, повышающих иммунитет растений и их устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов. Это так называемое праймирование, которое, по аналогии с иммунизацией млекопитающих, подготавливает растение к более быстрому и выраженному иммунному ответу. Основано праймирование на существовании у растений механизма системной приобретенной резистентности (Systemic Acquired Resistance или SAR), которая развивается в ответ на механическое повреждение, инфицирование, поедание частей растения насекомыми и воздействие других факторов и обеспечивает неспецифическое повышение устойчивости растения. При этом в тканях растений накапливаются сигнальные и защитные компоненты, обеспечивающие быструю активацию механизмов адаптации к стрессу. Стимулирующие рост растения симбиотические микроорганизмы, например эндофитные бактерии рода *Bacillus*, защищают растения от фитопатогенов по принципу антагонизма, не нанося ущерб растению, но вызывая развитие так называемой индуцированной системной резистентности (Induced Systemic Resistance или ISR), которая фенотипически и функционально сходна с SAR. Актуальными задачами как с фундаментальной, так и с практической точки зрения является поиск новых штаммов эндофитных бактерий и изучение механизмов развития ISR, увеличивающую иммунную защиту растений. Диссертационная работа Алексеева В.Ю. посвящена изучению механизма повышения устойчивости пшеницы к насекомому-вредителю – обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* (Rond.), под действием эндофитных бактерий рода *Bacillus*.

Научная новизна исследования

В диссертационной работе Алексеева В.Ю. впервые проведено исследование способности эндофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* из коллекции ИБГ УФИЦ РАН и синтезируемых ими метаболитов вызывать активацию защитных реакций

растений пшеницы и повышать их устойчивость к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*. Показано, что прямой афицидный эффект исследуемых штаммов бактерий по отношению к обыкновенной злаковой тле во многом обусловлен их способностью продуцировать липопептиды и Сгу-белки. Выявлено, что под действием эндофитных бактерий рода *Bacillus* повышается устойчивость растений пшеницы, зараженных тлей, которая, возможно, обусловлена изменением редокс-статуса и экспрессии генов защитных PR-белков разных классов. Показана важная роль бактериальных липопептидов в этом процессе. В работе впервые обнаружены аддитивные эффекты бактериальных композиций, позволяющие более эффективно, чем бактериальные монокультуры, повысить устойчивость растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле. Доказана роль липопептидов сурфактина и итурина в развитии аддитивного эффекта композиции штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования

Результаты исследования Алексева В.Ю. представляют научный интерес как с фундаментальной, так и практической точки зрения. Фундаментальная значимость работы обусловлена полученными новыми данными о том, как взаимодействуют эндофитные бактерии с растениями, увеличивая устойчивость последних к стрессу. В работе проведено исследование новых штаммов эндофитных бактерий рода *Bacillus*, изучена их способность колонизировать растения пшеницы и повышать их устойчивость к воздействию насекомого-вредителя этой культуры – обыкновенной тле, проведен анализ механизмов прямого и косвенного защитного действия симбиотических эндофитных штаммов бактерий и выявлена важная роль липопептидов и Сгу-белков. Прикладная значимость работы обусловлена попыткой создать на основе исследуемых штаммов эндофитных бактерий препарата для праймирования растений пшеницы с целью повышения их устойчивости к обыкновенной тле, которая является причиной снижения урожайности данной культуры. В работе проведен сравнительный анализ действия на растения пшеницы различных штаммов рода *Bacillus* и продуцируемых ими метаболитов, липопептидов и Сгу-белков, оценены антагонистические свойства бактериальных штаммов, выявлены композиции штаммов бактерий, характеризующиеся аддитивным действием, возможно, за счет стимуляции различных сигнальных путей в растении, подобраны оптимальные концентрации клеток бактерий в данных композициях, позволяющие наиболее эффективно повысить устойчивость растений.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Диссертационная работа Алексева В.Ю. проведена на достаточно высоком методическом уровне. Достоверность и обоснованность выводов, а также основных результатов диссертационной работы не вызывают сомнений ввиду разнообразия используемых в работе методов исследования, выполнения экспериментов на репрезентативных выборках с использованием положительных и отрицательных контролей, а также применения современных методов статистической обработки полученных данных.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Алексева В.Ю. изложена на 230 страницах и содержит все необходимые разделы, включая введение, обзор литературы, описание

методов исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы из 247 современных источников. Результаты работы представлены в 21 таблице и прекрасно проиллюстрированы 20 рисунками.

Во введении автором обосновывается актуальность исследования, а также его новизна и практическая значимость, приводятся поставленные цели и задачи исследования. Целью данной работы была оценка роли эндофитных бактерий рода *Bacillus* и их метаболитов в индукции защитных реакций растений, обеспечивающих повышение устойчивости пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*. Приведенные задачи отражают основные этапы реализации поставленной цели исследования.

Во внушительном по объему обзоре литературы представлены известные на сегодняшний день данные о роли взаимодействия симбиотических ростостимулирующих бактерий и растений в повышении устойчивости последних к абиотическому и биотическому стрессу, в частности – воздействию насекомых-вредителей. В литературном обзоре подробно рассмотрены прямые и косвенные механизмы, которые реализуются симбиотическими ростостимулирующими бактериями и обеспечивают повышение защиты растения-хозяина. Также в обзоре в деталях описаны структурные особенности и функциональная активность различных вторичных метаболитов бактерий, их роли как в жизнедеятельности бактерий, так и в развитии у растений системной индуцированной устойчивости.

В главе «Материалы и методы» довольно подробно описаны использованные в работе методики. Следует отметить разнообразие методов исследования, использованных в данной работе: различные микробиологические методы; разнообразные биологические тесты, определяющие взаимоотношения – эндофитные бактерии-растение-насекомые-вредители; методы оценки активности целого ряда ферментов, содержащихся в супернатантах бактериальных культур; хроматографические методы, позволяющие определить содержание продуцируемых в культуральную жидкость вторичных метаболитов бактерий; твердофазный конкурентный иммуноферментный анализ, использованный для определения содержания фитогормонов; ПЦР; ПЦР в режиме реального времени.

В Главе «Результаты и Обсуждения» представлены результаты работы и их обсуждение. Поражает объем проделанной работы и количество обработанных и проанализированных экспериментальных данных. Результаты описаны последовательно по разделам, логично и четко изложены, приводятся обоснования необходимости определения того или иного параметра. В каждом разделе и подразделах сделан вывод по полученным результатам и проведено их сопоставление с известными литературными данными.

В «Заключении» подводятся итог результатов всех исследований, резюмируются ключевые положения диссертационной работы.

Выводы диссертационного исследования четко сформулированы и соответствуют поставленным целям и задачам.

Автореферат в краткой форме отражает суть диссертационной работы, содержит положения, выносимые на защиту, основные результаты исследования, выводы и список работ, опубликованных по теме диссертации.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 15 печатных работ, в том числе 7 статьях в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки

России, из них 4 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах. Промежуточные результаты были доложены на целом ряде российских и международных научных мероприятиях в виде устных и стендовых докладов.

Общие вопросы и замечания по работе

Существенных замечаний к содержанию работы нет. Однако, имеются отдельные вопросы и комментарии, в целом не противоречащие положительной оценке работы и не снижающие ее научно-практическую значимость.

1. Известно, что праймирование растений осуществляется не только препаратами на основе бактерий, но и другими элиситорами, например компонентами клеточных стенок бактерий и грибов, а также различными фитогормонами, участвующими в развитии системной приобретенной резистентности. В литературном обзоре, на мой взгляд, было бы интересно, отразить преимущества и недостатки каждого из этих вариантов.

2. Литературный обзор содержит всего два рисунка и одну таблицу. Безусловно, дополнительные рисунки и таблицы позволили бы лучше проиллюстрировать и структурировать представленный в обзоре большой массив данных. Например, не хватает таблицы по классификации защитных белков, связанных с патогенезом (PR-белков), речь о которых довольно часто идет в тексте диссертации.

3. Насколько стабильно эндофитные бактерии синтезируют исследуемые в работе ферменты, гормоны и липопептиды. Как влияют на их биосинтез условия культивирования (состав среды, температуры и прочее). И можно ли прогнозировать, как он будет происходить в растительных тканях.

4. В таблицах 3.3, 3.7 и 3.12 лучше было бы указать не количество мкл суспензии бактерий, а количество клеток. Также в таблицах и на рисунках, посвященных эффектам липопептид-богатых фракций приведена их концентрация мкг/мл, но неясно чему именно она соответствует.

5. Из текста диссертации не совсем ясно, что представляли собой липопептид-богатые фракции. В работе есть подтверждение содержания в них липопептидов (по времени удержания на обращенно-фазовой колонке в сопоставлении с контролем), но нет описания, насколько однородными были эти фракции. И проводился ли масс-спектрометрический анализ данных фракций.

6. Известно, что PR-белки различных классов в геномах растений присутствуют в виде множественных изоформ, некоторые из которых синтезируются в тканях растений конститутивно, другие – только в условиях стресса, а гены, кодирующие некоторые изоформы, возможно, вообще не экспрессируются. В тексте диссертации отсутствует пояснение, по какому принципу были отобраны гены PR-белков разных классов, экспрессия которых оценивалась в работе.


Заключение

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*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия (биологические науки) является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, посвященной актуальной проблеме, имеющей важное значение для биологии и сельского хозяйства, исследования влияния эндофитных бактерий и их метаболитов на устойчивость сельскохозяйственных культур. Диссертационная работа

соответствует требованиям п.9-11, 13, 14, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09. 2013 г. № 842, а ее автор Алексеев Валентин Юрьевич несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия (биологические науки).

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник отдела «Учебно-научный центр» Государственного Научного Центра Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, кандидат химических наук (специальность 02.00.10 – биоорганическая химия)


Финкина Екатерина Ивановна
«19» декабря 2023 г.

Подпись Финкиной Е.И. заверяю:

Заведующий отделом биоматериалов и бионанотехнологий, заведующий лабораторией молекулярной биофизики, руководитель группы перспективного научного планирования, учёный секретарь Государственного Научного Центра Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, доктор физико-математических наук,




Олейников Владимир Александрович

Согласна 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*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности по специальности 1.5.4 Биохимия (биологические науки).


Финкина Екатерина Ивановна

Финкина Екатерина Ивановна

Адрес места работы: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10, Государственный Научный Центр Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Должность: старший научный сотрудник

Телефон организации: +7 (495) 335-01-00

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

E-mail оппонента: finkina@mail.ru