

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«САРАТОВСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» (ФИЦ СЦ РАН)

ул. Рабочая, 24, г. Саратов, 410028

Тел./факс (845-2) 23-45-10, 27-14-36. E-mail: [sncransar@san.ru](mailto:sncransar@san.ru), [www.sncran.ru](http://www.sncran.ru)

УТВЕРЖДАЮ

И.о. директора Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Федерального исследовательского центра  
«Саратовский научный центр  
Российской академии наук»  
(ФИЦ СЦ РАН)

доктор технических наук,  
профессор  
Кушников Вадим Алексеевич



«15» декабря 2023 г.

**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр  
Российской академии наук» (ФИЦ СЦ РАН)  
на диссертацию Алексеева Валентина Юрьевича на тему  
«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)

Диссертационная работа В.Ю. Алексеева посвящена исследованиям инсектицидных метаболитов бактерий рода *Bacillus* (липопептидов и Сгу-токсина), их роли в способности к эндофитному образу жизни микроорганизмов и участию в индукции неспецифических защитных реакций пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*, связанных с изменениями содержания активных форм кислорода и экспрессии генов патоген-индуцируемых белков у растений. В работе изучены различные аспекты действия на растения и насекомых чистых и бинарных культур бактерий рода *Bacillus*, а также выделенных автором отдельных липопептид-богатых фракций и их смесей.

В настоящее время имеется ограниченное количество биологических препаратов против насекомых-вредителей, питающихся флоэмным соком, и борьба с этими вредителями сводится, в основном, к применению химических инсектицидов, загрязняющих окружающую среду. Соответственно, поиск и изучение новых перспективных штаммов эндофитных бактерий, обладающих как прямыми инсектицидными свойствами, так и опосредованно способствующих развитию

фитоиммунитета против вредителей являются основой для разработки экологически дружественных биопрепаратов для защиты растений. А получение сведений об особенностях молекулярных механизмов проявления бактериями полезных для деятельности человека свойств является несомненно актуальной задачей.

Научная новизна данной диссертации определяется использованием композиций штаммов и смесей липопептидных фракций, обладающих инсектицидной активностью, в изучении индукции системной устойчивости растений к насекомым-вредителям. Показано повышение эффективности колонизации растений при инокуляции двумя штаммами рода *Bacillus*, продуцирующими липопептиды, и участие липопептидов бацилл как в проявлении в прямого афицидного эффекта в отношении к обыкновенной злаковой тле, так и в опосредованном формировании различных типов устойчивости растений к насекомым-вредителям. Впервые выявлены аддитивные эффекты при совместном использовании двух штаммов рода *Bacillus* в повышении устойчивости пшеницы к обыкновенной злаковой тле.

Практическая значимость полученных результатов связана с формированием 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, ростстимулирования и иммуномодуляции. В том числе, для создания компонентов биопрепаратов для эффективной биологической борьбы со злаковой тлей на посевах пшеницы. Полученные результаты и методические подходы можно рекомендовать к внедрению в организациях, работающих в областях агро- и биотехнологии.

Обоснованность положений, выводов, сделанных рекомендаций, достоверность результатов обеспечены глубокой литературной проработкой темы диссертации, надежностью использованных биохимических и микробиологических методов исследования, адекватной статистической обработкой экспериментальных результатов.

Структура и содержание диссертационной работы В.Ю. Алексеева выдержаны в традиционном стиле. Диссертация представлена на 230 страницах в трех основных разделах. Включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть с описанием объектов и методов исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений и перечень цитируемой литературы из 247 источников, 21 таблицы и 20 рисунков.

Во введении дана постановка проблемы, представлены основные характеристики изучаемых объектов, обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследований. Описана новизна полученных результатов, их научно-практическая значимость. Дана общая характеристика использованным в работе методологическим подходам. Представлены положения, выносимые на защиту. Сформулирован собственный вклад диссертанта. Отмечена связь работы с проектами, поддержанными двумя грантами РФФИ и грантом Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых. Приведена информация об апробации работы на ряде научных конференций и о списке 15 публикаций, включающем 7 статей в журналах, в том числе 4 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science.

Раздел 1 посвящен обзору литературы. В нем дано описание обыкновенной злаковой тли и различных типов устойчивости растений к этому насекомому-вредителю. А также рассмотрены бактерии рода *Bacillus* как продуценты биологически активных молекул, в том числе обладающих инсектицидной активностью. Обсуждаются ростстимулирующий эффект бацилл в отношении растений и способность этих бактерий повышать уровень защищенности растений от насекомых. И в качестве результирующей части раздела проанализированы потенциальные возможности более эффективного использования инокулированных бактерий для получения многостороннего положительного эффекта для роста и устойчивости растений.

В разделе 2, экспериментальной части, представлены материалы и методы исследования, включая объекты исследования и условия проведения экспериментов. Подробно описаны микробиологические методы культивирования бактерий и определения их численности во внутренних тканях растений. Изложены процедуры определения

инсектицидной активности бактерий и выделенных автором липопептид-богатых фракций в отношении к обыкновенной злаковой тле. Используемые в работе биохимические и молекулярно-биологические методы включают: фотометрическое определение активности ферментов и концентрации перекиси водорода в растениях, экстракции липопептид-богатых фракций из культуральных жидкостей бактерий, высокоэффективную жидкостную хроматографию, иммуоферментное определение фитогормонов, определение присутствия генов методом ПЦР, и количественное ПЦР в реальном времени.

Раздел 3 посвящен обсуждению результатов диссертационной работы, представленных в четырех подразделах, включающих: описание бактерий *Bacillus* spp. как эндофитных рост-стимуляторов, продуцирующих липопептиды (подраздел 3.1); характеристику выделенных липопептидных фракций в качестве инсектицидных препаратов (подраздел 3.2); участие бактерий рода *Bacillus* и продуцируемых ими липопептидов в формировании устойчивости растений к обыкновенной злаковой тле (подраздел 3.3); анализ биохимических изменений, происходящих в растениях, инокулированных бактериями или обработанных липопептидами, и приводящих к формированию защиты от насекомых (подраздел 3.4).

Результаты микробиологических и биохимических экспериментов, представленные в подразделе 3.1, продемонстрировали эндофитный образ жизни штаммов бактерий рода *Bacillus*, которые были исследованы в работе, и способность синтезировать разные классы инсектицидных соединений. Используя разные концентрации бактериальных клеток в инокуляте или разные аликвоты липопептид-богатых фракций, подобраны наиболее эффективные для колонизации и стимулирования роста растений соотношения.

Данные, приведенные в подразделе 3.2, продемонстрировали афицидные свойства в отношении к обыкновенной злаковой тле использованных в работе бактерий рода *Bacillus* и синтезированных ими инсектицидных соединений. Приведены результаты действия на жизнеспособность насекомых как чистых бактериальных культур и отдельных фракций, так и их композиции, продемонстрировавшие в некоторых вариантах аддитивный эффект.

Результаты сравнительных исследований бактерий рода *Bacillus* и синтезированных ими инсектицидных соединений, отраженные в подразделе 3.3, выявили концентрационную зависимость количества бактерий или липопептид-богатых фракций в инокуляте на рост-стимулирующее действие в отношении листьев пшеницы, заселенных обыкновенной злаковой тлей. Установлено понижение плодовитости и коэффициента размножения тли и повышение смертности нимф для растений, инокулированных бактериями рода *Bacillus* или обработанных липопептид-богатыми фракциями.

В подразделе 3.4, связанном с результатами индукции защитных реакций пшеницы к обыкновенной злаковой тле, установлено, что предпосевная обработка зерновок бактериями рода *Bacillus* приводит к более сильному накоплению перекиси водорода и повышению активности пероксидазы через 24 и 72 часа после заселения растений обыкновенной злаковой тлей. Анализ активности генов, кодирующих различные PR-белки, выявил, что предпосевная обработка бактериями рода *Bacillus* активировал этилен-сигнальный путь фитоиммунитета у растений, заселенных тлей. При этом для некоторых вариантов со штаммами *Bacillus subtilis* продемонстрирована дополнительная индукция салицилатного-сигнального пути, а для штаммов *Bacillus thuringiensis* – жасмонатного-сигнального пути. Характер влияния липопептид-богатых фракций на экспрессию PR-генов был сходным с влиянием соответствующих бактериальных штаммов.

Приведенные в диссертации Заключение и Выводы в должной мере отражают существо и значимость полученных результатов в фундаментальном и прикладном аспектах.

При изучении и коллективном обсуждении диссертационной работы В.Ю. Алексева были сформулированы следующие замечания:

- 1) В таблице 3.1 на стр. 109 диссертации представлены данные, позволившие сделать вывод об эндофитности штаммов, использованных в работе. Что служило критериями эндофитности/неэндофитности? Был ли использован какой-либо негативный контроль? Для штаммов *B. subtilis* 11BM, *B. thuringiensis* B-5351 и *B. thuringiensis* B-6066 значения

- титра бактерий у 7-дневных проростков составили от  $1,5 \times 10^4$  до  $6,9 \times 10^4$  на 1 грамм сырой массы. Учитывая, что при инокуляции вносились  $10^6$  клеток на 1 растение (раздел 2.3.2, стр. 90), можно ли считать такое низкое содержание клеток указанных штаммов достаточным, чтобы считать их эндофитами?
- 2) В таблицах 3.7, 3.11, 3.13 и 3.15 приведены данные для разных концентраций бактериальных клеток и липопептид-богатых фракций или соотношений компонентов смесей. В большинстве случаев в качестве наиболее эффективных отмечены наименьшие из использованных концентраций или соотношений. Чем был вызван выбор указанных в таблицах концентраций и соотношений? Проводились ли исследования действия бактериальных клеток и липопептид-богатых фракций при меньших концентрациях?
  - 3) На основании результатов, представленных в таблице 4 автореферата (эти же данные представлены в таблицах 3.9 и 3.10 диссертации) диссертантом делается вывод об том, что подобранные композиции бактериальных штаммов проявили аддитивный эффект (в смеси афицидность была больше, чем при индивидуальной обработке). Однако при анализе указанных значений процента смертности тли можно заметить, что ни одна из композиций штаммов по данному параметру не превышает значение  $78,5 \pm 7,6$ , указанное для варианта с чистой культурой *B. thuringiensis* В-5351. Соответственно, на каком основании сделан вывод об аддитивном эффекте исследованных композиций штаммов?
  - 4) В тексте диссертации присутствуют неточности и опечатки. Так, в списке сокращений не указано расшифровка «ЛБФ – липопептид-богатые фракция», наиболее часто используемая аббревиатура в данной диссертации. На странице 109 указано: «к эндофитам отнесено более 200 видов бактерий из родов *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Penibacillus* и др.». Следует отметить, что в таксономии бактерий *Acidobacteria* и *Proteobacteria* имеют ранг типов, а не родов. И в современной классификации *Proteobacteria* предложено называть *Pseudomonadota*. Кроме того, присутствуют опечатки, например, на стр. 109 – правильное написание рода «*Pgenibacillus*», на стр. 131 1-ый абзац следовало бы написать «липопептид-богатые фракция», на стр. 140 последний абзац, при обсуждении аддитивного эффекта следовало бы дать ссылку на таблицу 3.9. В некоторых случаях отсутствует запятая в обороте «листьев пшеницы, заселенных обыкновенной злаковой тлей» (стр. 5, 37, 149, 150, 157, 163-167, 188).

Данные замечания имеют уточняющий, технический характер, не затрагивают существа представленных в диссертации убедительных экспериментальных результатов и не влияют на ее позитивную в целом оценку.

Согласно Паспорту научной специальности 1.5.4. Биохимия, диссертационная работа В.Ю. Алексеева соответствует биологической отрасли науки, специальности 1.5.4 – Биохимия, направлению 5. «Анализ и синтез биологически активных веществ, выяснение их физиологического действия и возможностей применения полученных веществ в медицине и других отраслях народного хозяйства», а также смежной специальности 1.5.6. Биотехнология. Данную диссертацию можно признать научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи выяснение роли инсектицидных метаболитов бактерий в успешности колонизации растений и индукции в них реакций фитоиммунитета при неблагоприятном воздействии насекомых-вредителей.

Таким образом, имеются все основания заключить, что по актуальности, научной новизне и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа отвечает требованиям, предъявляемой к кандидатским диссертациям в пунктах 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», с изменениями, утвержденными постановлением Правительства РФ от 18.03.2023 г. № 415, а ее автор Алексеева Валентина Юрьевича заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН (протокол № 78 от 14 декабря 2023 г.).

### Заключение

Таким образом, имеются все основания заключить, что по актуальности, научной новизне и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа отвечает требованиям п. 9-11, 13,14, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09. 2013 г. № 842 (с изменениями и дополнениями от: 30 июля 2014 г., 21 апреля, 2 августа 2016 г., 29 мая, 28 августа 2017 г., 1 октября 2018 г., 20 марта, 11 сентября 2021 г., 26 сентября 2022 г., 26 января, 18 марта, 26 октября 2023 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Алексеев Валентин Юрьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия (биологические науки).

Отзыв обсужден и одобрен на заседании лаборатории иммунохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН) (протокол № 78 от 14 декабря 2023 г.).

Старший научный сотрудник  
лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН  
кандидат биологических наук (03.00.07 –  
микробиология и 03.00.04 – биохимия)

Геннадий Леонидович Бурьгин

Институт биохимии и физиологии растений и  
микроорганизмов – обособленное структурное  
подразделение Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Федерального  
исследовательского центра «Саратовский научный  
центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН).  
410049, г. Саратов, просп. Энтузиастов 13.  
Тел./факс (8452)97-04-44;  
e-mail: burygingl@gmail.com; <http://ibppm.ru>

Подпись Геннадия Леонидовича Бурьгина  
ЗАВЕРЯЮ:  
ученый секретарь ФИЦ СЦ РАН

к.б.н. Ольга Геннадьевна Селиванова

15 декабря 2023 г.

#### Данные о ведущей организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ФИЦ СЦ РАН), 410028, Российская Федерация, город Саратов, ул. Рабочая, 24 тел.: 8 (452) 27-14-36; e-mail: [sccraansar@san.ru](mailto:sccraansar@san.ru), <http://снцран.рф>, и.о. директора, д.т.н. Кушников Валдим Алексеевич.