

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.218.01, СОЗДАННОГО НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ УФИМСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК, МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ
УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело №

решение диссертационного совета от 24 января 2024 года № 2

О присуждении Алексееву Валентину Юрьевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Роль эндофитных микроорганизмов рода *Bacillus*, синтезирующих метаболиты с инсектицидными свойствами, в устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*» по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки) принята к защите 25 октября 2023 года (протокол заседания № 20) диссертационным советом 24.1.218.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (450054, город Уфа, Проспект Октября, 71, лит. 1Е; сайт организации: <http://ufaras.ru/>). Создание диссертационного совета утверждено приказом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 271/нк от 13 ноября 2018 года (частичные изменения от 30 октября 2020 года № 661/нк, 03 июня 2021 года № 561/нк, 25 января 2022 года № 75/нк, 22 марта 2022 года №257/нк, 14 февраля 2023 года №216/нк).

Текст диссертации размещен на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук 25 сентября 2023 года (<http://ufaras.ru>)

Соискатель Алексей Валентин Юрьевич 1 августа 1994 года рождения, в 2018 году с отличием окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, по специальности Экология и природопользование (диплом ВСА 100224 3598695). В период подготовки диссертации с 01.10.2018 по 30.09.2022 годы соискатель Алексей Валентин Юрьевич обучался в очной аспирантуре в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении Уфимский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук по направлению подготовки 06.06.01 – биологические науки, направленность (профиль) 1.5.21. – физиология и биохимия

растений. Диплом об окончании аспирантуры № 02240144549 (рег. № 18) от 12.09.2022 и справка об обучении № 77/654.2 от 23 августа 2023 года и Сведения о сданных кандидатских экзаменах по дисциплине «Иностранный язык (английский)» от 18 июня 2019 года, кандидатский экзамен по предмету «История и философия науки» от 25 июня 2019 года, кандидатский экзамен по специальности «Биохимия» от 05 декабря 2022 года прилагаются к личному делу.

С ноября 2022 года по настоящее время Алексеев Валентин Юрьевич работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории молекулярной фармакологии и иммунологии института биохимии и генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук.

Диссертация выполнена в лаборатории биохимии иммунитета растений института биохимии и генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук.

Научный руководитель – кандидат биологических наук, Веселова Светлана Викторовна, старший научный сотрудник лаборатории биохимии иммунитета растений института биохимии и генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук.

Официальные оппоненты

Белимов Андрей Алексеевич – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории ризосферной микробиологии №1 Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»;

Финкина Екатерина Ивановна – кандидат химических наук, 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

дали положительные отзывы на диссертацию (отзывы прилагаются).

Официальный оппонент, кандидат химических наук Финкина Екатерина Ивановна в своем положительном отзыве, отмечая актуальность, новизну, научную и практическую значимость работы, озвучила следующие вопросы:

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.

Официальный оппонент, доктор медицинских наук Белимов Андрей Алексеевич в своем положительном отзыве, отмечая новизну и практическую значимость работы, озвучил следующие замечания и вопросы:

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 Bth-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.

В отзывах официальных оппонентов дано заключение, что диссертационная работа 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*» по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки) является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Веселовой Светланы Викторовны, в которой представлено решение крупной научной проблемы, имеющей важное фундаментальное и прикладное значение, в работе сформулированы принципы 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. Диссертационная работа Алексеева Валентина Юрьевича отвечает критериям п. 9, 10, 11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата наук, а ее автор Алексеев Валентин Юрьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки).

Соискатель Алексеев Валентин Юрьевич дал исчерпывающие ответы на вопросы оппонента к.х.н Финкиной Екатерины Ивановны и д.б.н. Белимова Андрея Алексеевича, которые полностью удовлетворили оппонентов. При ответе на вопросы оппонента к.х.н. Финкиной Екатерины Ивановны Алексеев Валентин Юрьевич указал на то, что: он согласен с предложением оппонента, что в литературном обзоре было бы интересно, отразить преимущества и недостатки праймирования растений бактериями и другими элиситорами. Отмечено, что литературный обзор был сфокусирован на объекте исследования – злаковой

тле и на двух группах бактериальных метаболитов с инсектицидными свойствами - липопептидах и Сгу-беках, элиситорные свойства этих бактериальных метаболитов обсуждаются в литературном обзоре. Также другим элиситорам – белкам слюны тлей, фрагментам хитина и фитогормонам в обзоре уделено внимание. Что касается синтеза бактериями метаболитов, изученных в данной диссертационной работе, то синтез бактериями ферментов, гормонов и липопептидов происходит постоянно, так как эти метаболиты необходимы для роста, развития и выживания бактерий. Указано, что ряд бактериальных ферментов необходим не только для обеспечения антагонизма по отношению к другим микроорганизмам, но и для получения дополнительных источников питания, а липопептиды необходимы также для подвижности бактерий и образовании биопленок. Гормоны используются бактериями для взаимодействия с растениями в рамках своей стратегии колонизации. Что касается влияния условий культивирования на синтез метаболитов. Безусловно, состав среды, температура и другие условия влияют на синтез метаболитов. В работе были использованы оптимальные для роста бацилл условия культивирования. LB среда, на которой выращивались бактерии, является пригодной для хорошего синтеза липопептидов, что доказано в работах других авторов. Что касается вопроса о прогнозировании синтеза бактериями метаболитов при колонизации растений. Изученные в данной работе бактериальные метаболиты также принимают участие в растительно-микробном взаимодействии, поэтому бактерии будут синтезировать метаболиты, находясь в растениях. Роль метаболитов при колонизации растений и борьбе с болезнями и вредителями растений доказана с помощью мутантов дефицитных по синтезу того или иного метаболита. В отсутствие синтеза того или иного метаболита бактерии плохо заселяют растения, теряют антагонистическую и рост-стимулирующую активности, не индуцируют иммунную систему растений. В данной диссертационной работе использована рекомбинантная линия бактерии *B. subtilis* 26Дсfp- дефицитная по синтезу сурфактина. В работе доказано, что сурфактин играет критическую роль во многих аспектах растительно-бактериального взаимодействия. Таким образом, можно заключить, что синтез этих метаболитов при нахождении бактерии в растительных тканях необходим и неизбежен.

Соискатель подробно ответил на вопросы оппонента, касающиеся раздела материалы и методы, приводя уточняющие комментарии.

В ответе Алексеева Валентина Юрьевича д.б.н. Белимову Андрею Алексеевичу прозвучало, что несмотря на то, что за последние 30 лет накоплено немало информации об эндофитах и область науки, изучающая эндофиты, бурно развивается, существует много пробелов в наших знаниях о механизмах действия эндофитов. В настоящее время большая

часть исследований эндофитных бактерий была проведена путем установления параллелизма между их действием и действием стимулирующих рост растений бактерий, присутствующих в ризосфере. Однако отличия ризосферы или филлосферы от среды внутренних тканей растений (эндосферы) очевидны и тем привлекают внимание ученых. К 2021 году были обобщены ключевые механизмы действия эндофитов и сообщены в многочисленных обзорных работах, некоторые из которых мы цитируем в диссертации. В качестве примеров приведены две работы, в которых как раз рассматривается конкуренция эндофитов с патогенами за пространство и питательные вещества (ответы подробно описаны в стенограмме защиты). Относительно вопроса об отличии штаммов и изолятов соискатель указал, что точных определений для терминов «штамм» и «изолят» в микробиологии и вирусологии нет. Часто эти определения взаимозаменяемы. Под изолятом подразумевают культуру микроорганизмов, взятую (т.е. изолированную) из какого-либо конкретного источника. Под штаммом подразумевают чистую культуру бактерий или иных микроорганизмов, выделенных из определенного источника и идентифицированных по тестам современной классификации. В данной диссертационной работе было использовано шесть штаммов и три изолята рода *Bacillus*. Пять из шести штаммов были ранее приобретены в других коллекциях, шестой штамм был ранее выделен и родовая и видовая принадлежность была идентифицирована путем секвенирования ДНК. Три изолята рода *Bacillus* были выделены из листьев пшеницы и картофеля и названы изолятами, так как они еще не секвенированы и не определен их вид. Относительно вопроса о форме движения бактерий «подергивание», соискатель обосновал термин следующим образом: подергивание — это независимая от жгутиков форма бактериальной транслокации на влажных поверхностях. Это происходит путем вытягивания, привязывания, а затем втягивания полярных пилей IV типа, которые действуют аналогично абордажному крюку. Название «подергивающаяся подвижность или подергивание» происходит от характерных прерывистых и нерегулярных движений отдельных клеток при просмотре под микроскопом. Относительно вопроса по разделу «Бактериальная обработка соискатель привел обоснованный ответ, в котором указал, что семена были поверхностно стерилизованы, чтобы исключить присутствие локализованных в поверхностных тканях микроорганизмов. После стерилизации семена проращивали в чашках Петри для контроля различных патогенов. Проверку семян на наличие эндофитов не проводили, так как это не входило в задачи работы. Однако стерильных растений в природе не бывает. Эндофиты находят в разных частях растений, в том числе в семенах. Скорее всего, в семенах пшеницы сорта Салават Юлаев, использованной в данной работе, также присутствовали свои эндофиты, которые невозможно убить поверхностной стерилизацией. В экспериментах

были использовали семена одного года урожая из одной партии. В экспериментах контрольные семена обрабатывали исследуемыми в работе бактериальными суспензиями, а затем проводили сравнение показателей между обработанными и необработанными растениями. Соответственно, на выводы, сделанные в нашей работе на основании сравнительных результатов, эндофиты семян не влияли.

Ведущая организация – Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук» в своем положительном отзыве, подписанном старшим научным сотрудником лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН, кандидатом биологических наук Бурыгиным Геннадием Леонидовичем, и утвержденным доктором технических наук, профессором, и.о. директора Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» в своем положительном отзыве, подписанном Кушниковым Вадимом Алексеевичем, указала, что результаты диссертационного исследования формируют принципы 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.

При изучении и коллективном обсуждении диссертационной работы В.Ю. Алексеева 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* В-5351 и *B. thuringiensis* В-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 вносилось 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* B-5351. Соответственно, на каком основании сделан вывод об аддитивном эффекте исследованных композиций штаммов?

Отвечая на вопросы ведущей организации, Алексеев В.Ю. отметил, что относительно критериев эндوفитности. В настоящее время в научной литературе существует серия определений для описания эндوفитов, но чаще всего используется определение Петрини (1991), в котором эндوفиты все организмы, которые колонизируют ткани растений в течение некоторой части своего жизненного цикла и не вызывают симптоматических инфекций у растений-хозяев. Таким образом, микроорганизм способный существовать во внутренних тканях растений может считаться эндوفитом, т.е. все исследованные в данной работе бактериальные штаммы могут считаться эндوفитами несмотря на сильные различия в количестве бактериальных клеток, определенных у разных штаммов внутри растения. Что касается абсолютного количества бактериальных клеток во внутренних тканях растений, то в литературе представлены цифры от 10^4 до 10^8 клеток эндوفитных микроорганизмов на грамм растительной ткани. Такие же абсолютные значения бактериальных клеток представлены в данной диссертационной работе. Относительно вопроса об использовании отрицательного контроля. В данной работе при исследовании свойств эндوفитности был использован отрицательный контроль, который представлял собой гомогенат из навески стерильных пробирочных растений не инокулированных бактериями. Культивирование этого гомогената на агаризованной LB среде давало отрицательный результат, поэтому он не указан в таблицах. Однако при описании метода мы не указали наличие отрицательного контроля, что будет учтено в будущем. При выборе концентраций бактериальных штаммов в смесях мы руководствовались результатами, полученными при изучении отдельных бактериальных штаммов и изолятов, где изучалось влияние бактерий в более широком диапазоне концентраций. При этом показано, что наименьшие концентрации бактерий не влияли или влияли слабо, а наибольшие концентрации ингибировали прорастание семян или прирост биомассы проростков. Поэтому при составлении смесей мы основывались на результатах

подбора рост-стимулирующих концентраций для индивидуальных штаммов и не брали в работу более низкие или более высокие концентрации бактерий. В большинстве композиций простое сложение рост-стимулирующих концентраций не приводило к увеличению энергии прорастания семян, а уменьшение рост-стимулирующей концентрации в 1.5 или 2 раза одного или обоих штаммов приводило к стимуляции прорастания при совместной обработке. При выборе концентраций липопептид-богатых фракций (ЛБФ) в смесях мы руководствовались результатами, полученными при изучении ЛБФ отдельных бактериальных штаммов и изолятов. Также был задан вопрос о соотношениях бактерий и ЛБФ в смесях. При подборе соотношений в смесях мы опирались на литературные данные и результаты, полученные ранее в лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН. В разных смесях более эффективными были различные соотношения. При дальнейших исследованиях влияния ЛБФ на выносливость растений и показатели антибиоза, кроме рост-стимулирующих концентраций были использованы более высокие концентрации до 10 мкг/мл. В этих экспериментах мы руководствовались результатами, полученными при изучении прямого инсектицидного действия ЛБФ на злаковую тлю, где было показано повышение смертности тли с повышением концентрации ЛБФ. Исследование опосредованного влияния более высоких концентраций ЛБФ показало, что они также, как и при прямом воздействии сильнее подавляли размножение тли, однако теряли рост-стимулирующие свойства по мере повышения их концентрации, воздействующей на растение. Наше исследование преследовало цель доказать, что низкие рост-стимулирующие концентрации также могут быть эффективными, как и высокие концентрации, ингибирующие рост растений.

Относительно вопроса об аддитивном эффекте бактериальных смесей при рассмотрении параметра афицидности. Результаты исследования афицидности показывают аддитивный эффект трех бактериальных композиций *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ (77%), *B. thuringiensis* В-5351 + *B. subtilis* 26Д (83%) и *B. thuringiensis* В-5351 + *B. subtilis* 11ВМ (80.4%). Согласно общепринятой формуле аддитивный эффект рассчитывается для двух компонентов смеси. Наши результаты показали, что значения афицидности для индивидуальных штаммов *B. subtilis* 26Д (66.7%) и *B. subtilis* 11ВМ (72.3%) гораздо ниже, чем в композициях. Таким образом, общий эффект в наших композициях больше, чем эффект одного штамма, что удовлетворяет формуле и на основании этих расчетов мы сделали вывод об аддитивном эффекте трех смесей на показатель афицидности.

Диссертационная работа и отзыв обсуждены и одобрены на заседании ученого совета 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.

В заключении отмечается, что по актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа «Роль эндофитных микроорганизмов рода *Bacillus*, синтезирующих метаболиты с инсектицидными свойствами, в устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*» отвечает требованиям, предъявляемой к кандидатским диссертациям 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 заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки)

Соискатель имеет 15 опубликованных работ, из которых 7 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК МОН РФ, в том числе 4 статьи, индексируемых в международных базах Web of Science и Scopus. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени кандидата наук работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. Публикации посвящены изучению влияния бактерий рода *Bacillus* и их метаболитов – липопептидов и Сгу-белков на развитие защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*, также изучена РНКазная активность бактерий, продукции бактериями гормонов и влияние этих метаболитов на свойства бактерий. Несколько работ посвящены изучению влияния бактериальных композиций и композиций липопептидов на развитие защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

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 эндوفитных 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).

На диссертацию и автореферат поступило 6 отзывов:

1. Отзыв кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника, руководителя группы репродуктивной биологии растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» **Захаровой Екатерины Владимировны**. Отзыв положительный, с тремя вопросами и замечаниями: 1) В работе сказано, что исследование проводилось на проростках и отдельных листьях пшеницы, но не указана фаза вегетации растений, листья которых использовались в работе. 2) С чем связан выбор гидропонного

выращивания растений, насколько полученные данные будут согласовываться с почвенными условиями? 3) В работе не отмечено, как проходила идентификация видовой принадлежности тли.

2. Отзыв доктора биологических наук, главного научного сотрудника, руководителя отдела геномики ВИР Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР) **Радченко Евгения Евгеньевича**. Отзыв положительный, без замечаний.

3. Отзыв кандидата биологических наук, заведующей сектором функциональной генетики злаков института цитологии и генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» **Шоевой Олеси Юрьевны**. Отзыв положительный, без замечаний.

4. Отзыв доктора биологических наук, заведующей лабораторией растительно-микробных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук **Марковой Юлии Александровны**. Отзыв положительный, без замечаний.

5. Отзыв доктора биологических наук, доцента, профессора кафедры экологии и безопасности Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уфимский университет науки и технологий» **Гариповой Светланы Равиленовны**. Отзыв положительный, без замечаний.

6. Отзыв кандидата биологических наук, доцента Федерального казенного образовательного учреждения высшего образования «Вологодский институт права и экономики Федеральной службы исполнения наказаний» **Платонова Андрея Викторовича**. Отзыв положительный, с одним комментарием 1) Несмотря на то, что положительный эффект действия бактерий рода *Bacillus* на рост и устойчивость сельскохозяйственных растений весьма широко доказан в лабораторных условиях, использование в экспериментальных препаратах на основе этих бактерий в условиях реального хозяйствования довольно часто терпит неудачу.

Соискатель Алексей Валентин Юрьевич ответил на все замечания, указанные в отзывах на автореферат диссертации. Отвечая на вопросы Захаровой Екатерины Владимировны о фазе вегетации растений, использованных в работе, соискатель указал, что фазы вегетации соответствовали проростку и кущению, так как эксперименты проводились, начиная с четырех суток и заканчивая 18 сутками. С отделенными листьями проводили эксперименты по определению афицидности бактериального штамма или ЛБФ. Листья

отделяли от проростков на седьмые сутки и помещали в пробирки с бактериальной суспензией или раствором ЛБФ. Выбор гидропонного выращивания растений связан со специфичностью лабораторных экспериментов. В гидропонной культуре гораздо легче поддерживать стерильность и влияние неучтенных внешних факторов. По поводу согласования данных в гидропонной культуре с почвенными условиями, соискатель на основании опубликованных с коллегами работ указал, что изученные в данной работе бактериальные штаммы не меняют своих свойств, как в условиях теплицы, так и в условиях поля (Sorokan et al., 2020; Veselova et al., 2022). Что касается идентификации видовой принадлежности тлей, то идентификацию проводили по морфологическим признакам (длина и ширина тела, окраска, длина усиков и т.д.), описанным в справочнике Радченко Е.Е. (2008).

Отвечая на вопрос Платонова Андрея Викторовича о неэффективности некоторых бактериальных штаммов при применении их в полевых условиях хотелось бы заметить, что существует достаточно много эффективных биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus*, а также *Pseudomonas* и *Streptomyces*. Хотелось бы отметить, что основу препарата фитоспорин-М (“Башинком”, Россия) составляет эндофитный бактериальный штамм *Bacillus subtilis* 26Д. Неэффективность некоторых бактериальных штаммов при переносе из лабораторных условий в поле может возникать по нескольким причинам. А именно: первое, несоблюдение специфичности действия штамма, второе, влияние факторов окружающей среды, третье, при отборе эффективного штамма не учитывалась его совместимость с другими сельскохозяйственными ресурсами, такими как удобрения, пестициды и фунгициды, четвертое, бактериальные препараты должны быть стабильными, пятое, успешное применение бактериальных препаратов в полевых условиях также зависит от взаимодействия растений и бактерий и может ограничиваться плохой колонизацией ризосферы, филосферы и эндосферы (ответы подробно описаны в стенограмме защиты).

Во всех отзывах на автореферат отмечается, что работа Алексева Валентина Юрьевича является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи, имеющей важное значение для биологической науки. Отмечено, что диссертационная работа выполнена в полном объеме на высоком научном и методическом уровне, выводы диссертации достоверны и полностью отражают поставленные задачи. Во всех отзывах указано, что диссертационная работа отвечает критериям п. 9, 10, 11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата наук, а ее автор Алексеев

Валентин Юрьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки) (отзывы прилагаются).

Выбор официальных оппонентов обосновывается следующим:

Белимов Андрей Алексеевич – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории ризосферной микрофлоры №1 Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», является высококвалифицированным специалистом в области изучения взаимодействия ризосферных микроорганизмов друг с другом и растениями, изучения роли микроорганизмов в адаптации растений к неблагоприятным почвенно-климатическим факторам и изучения механизмов устойчивости и интеграции компонентов растительно-микробных систем в стрессовых условиях, что предполагает возможность всестороннего анализа оппонируемой работы.

Финкина Екатерина Ивановна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник отдела «Учебно-научный центр» Государственного Научного Центра Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, является высококвалифицированным специалистом в области изучения структуры, биологических свойств и молекулярных механизмов действия природных пептидных антибиотиков, разработку биотехнологических способов их получения. Объектами исследований являются антимикробные пептиды бактериального, грибкового, растительного и животного происхождения, в том числе из бактерий рода *Bacillus*, что предполагает возможность всестороннего анализа оппонируемой работы.

Оппоненты имеют соответствующие публикации в журналах из Перечня ВАК и дали свое согласие быть оппонентами диссертационной работы Алексева Валентина Юрьевича.

Выбор ведущей организации обусловлен тем, что в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр российской академии наук» проводят научные исследования по направлениям, соответствующим теме диссертационного исследования в области комплексных исследований межклеточных и межорганизменных коммуникаций в растительно-микробных ассоциациях с применением биохимических, биоинформатических и развиваемых оригинальных иммунохимических методов. Результаты работ сотрудников данного учреждения широко известны как в российских, так и международных научных кругах.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

предложены принципы 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;

показано, что прямой афицидный эффект изученных бактерий *Bacillus* spp. по отношению к обыкновенной злаковой тле *S. graminum* проявлялся благодаря синтезу бактериями липопептидов и Сгу-белков;

установлено, что ЛБФ и СгуIIa белок бактерий *Bacillus* spp. играли важную роль в индукции СИУ растений пшеницы к *S. graminum*, связанной с изменениями в редокс-статусе и экспрессии генов патоген-индуцируемых белков у растений;

доказана критическая роль ЛП сурфактина в формировании устойчивости растений пшеницы к злаковой тле *S. graminum* опосредованной бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д;

установлено, что аддитивный эффект бактериальных композиций будет проявляться при соблюдении некоторых принципов при их составлении;

доказана роль липопептидов сурфактина и итурина в развитии аддитивного эффекта смеси штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказана роль липопептидов и Сгу-белков в развитии как прямой, так и опосредованной устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс современных методов биохимии и молекулярной биологии, физиологии растений, микробиологии, статистики;

изложены результаты, которые углубляют и расширяют представления о роли бактериальных метаболитов с инсектицидными свойствами (Сгу-белков и ЛП) в индукции физиологических и биохимических механизмов устойчивости растений к злаковой тле;

выявлена зависимость аддитивных эффектов бактериальных композиций от сочетания разных метаболитов, антагонизма штаммов по отношению друг к другу, степени

эндофитности штаммов индивидуально и в композиции и подбора концентраций бактериальных штаммов;

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны принципы создания комплексных биопрепаратов на основе композиций бактериальных штаммов;

определена роль липопептидов и Сгу-белков в развитии как прямой, так и опосредованной устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле;

предложено: изученные бактериальные штаммы и изоляты рода *Bacillus* рекомендовать в качестве компонентов биопрепаратов для эффективной биологической борьбы со злаковой тлей *S. graminum* Rond. на посевах пшеницы.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

для экспериментальных работ – достоверность полученных результатов подтверждается воспроизводимостью и многочисленностью проведённых экспериментов, а также наличием положительных и отрицательных контролей, использованием современного научного оборудования, валидированных методов и анализом результатов с применением статистических методов.;

теория работы основана на анализе существенного объема научной литературы по изучаемой тематике работы, на известных данных и фактах, согласующихся с ранее опубликованными материалами по теме диссертации;

идея базируется на анализе современной отечественной и зарубежной литературы по изучению роли самих бактерий рода *Bacillus* и бактериальных метаболитов в развитии устойчивости растений к насекомым-вредителям;

использованы современные данные научно-исследовательских работ, связанные с темой диссертации и опубликованные в рецензируемых научных изданиях;

установлена сопоставимость полученных результатов настоящего исследования с данными, опубликованными в более ранних работах зарубежных и отечественных научных авторов. Вместе с тем, в проведенном исследовании получены новые приоритетные результаты о роли липопептидов и Сгу-белков в устойчивости растений к злаковой тле;

использованы современные методы лабораторных исследований, а также методы статистической обработки результатов. Для интерпретации результатов привлечены сведения из многих литературных источников.

Личный вклад соискателя заключается в непосредственном участии в выполнении всех этапов исследования. Формулировка научной проблемы и основной идеи, планирование научного исследования осуществлялись совместно с научным руководителем, кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником С.В. Веселовой. Обзор литературы, проведение биохимических, микробиологических и молекулярных исследований, анализ и статистическая обработка полученных результатов, оформление диссертационной работы проводились соискателем самостоятельно. Публикации результатов работы в научной литературе осуществлялось автором совместно с коллегами, представление результатов в виде докладов на конференциях осуществлялось лично.

В ходе защиты диссертации критические замечания высказаны не были, заданы вопросы уточняющего и конкретизирующего характера. Соискатель Алексеев Валентин Юрьевич ответил на все вопросы в ходе заседания.

На заседании 24 января 2024 года Диссертационный совет пришел к выводу, что совокупность защищаемых положений позволяет заключить, что диссертация Алексева Валентина Юрьевича «Роль эндофитных микроорганизмов рода *Bacillus*, синтезирующих метаболиты с инсектицидными свойствами, в устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*» имеет большое научное и практическое значение для решения ряда фундаментальных проблем анализа и синтеза биологически активных веществ, выяснения их физиологического действия и возможностей применения полученных веществ в сельском хозяйстве. Диссертация является цельным и законченным научным исследованием, обладающим внутренним единством изложения, выводы полностью соответствуют поставленным задачам и подчинены единству концепции диссертационного исследования.

Диссертационная работа Алексева Валентина Юрьевича представляет собой научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям п. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

На заседании 24 января 2024 года диссертационный совет 24.1.218.01 принял решение присудить Алексееву Валентину Юрьевичу ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки).

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 7 докторов наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки), участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 18, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета 24.1.218.01, д.б.н., профессор, член- корреспондент РАО	  / Хуснутдинова Эльза Камилевна
Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.218.01, д.б.н., доцент	 / Корытина Гульназ Фаритовна
	«24» января 2024 года