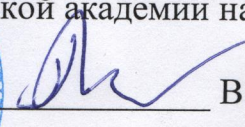


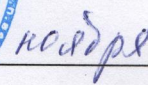
Утверждаю

и. о. директора Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения
Российской академии наук



д.б.н.

 В.И. Воронин

 2021 г.

Отзыв ведущей организации

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Сибирского института физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Российской академии наук
на диссертацию Сарваровой Елены Рафисовной
«Поиск новых свойств эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* СОНН.»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 «Микробиология»

Актуальность темы диссертации. В современном растениеводстве для борьбы с вредителями активно используются пестициды. Однако эти соединения обладают высокой токсичностью и способностью накапливаться во внешней среде. Альтернативой является

использование биопрепаратов на основе микроорганизмов, обитающих в ризо- и эндосфере растений, т.н. PGPR и PGPE. Эта группа бактерий оказывает разнонаправленное благоприятное воздействие на растительный организм, оказывая непосредственное и опосредованное влияние на его устойчивость к биотическим и абиотическим стрессовым воздействиям. Если ризосферные микроорганизмы изучены достаточно полно, и некоторые из них вошли в состав различных микробных препаратов, то эндофитные бактерии практически неизвестны. Не изучены или слабо изучены их пути попадания и особенности взаимодействия с организмом хозяина и с другими представителями растительного микробиома. Мало сведений о распространенности

явления «эндофитность» среди мира бактерий и набору признаков, способствующих этому стилю жизни. С другой стороны уже понятно, что растения обладают собственным микробиоценозом, необходимым для их жизнедеятельности. В связи с этим диссертационная работа Е.Р. Сарваровой, направленная на исследование пути проникновения, взаимодействия и возможного использования эндофитных бактерий *Bacillus subtilis*, несомненно, актуальна. Особый интерес вызывает изучение РНКазной активности эндофитов и их возможное использование в защите растений от вирусных инфекций.

Достоверность и научная новизна. Результаты, приведенные в диссертационной работе, получены с применением комплекса микробиологических, биохимических и молекулярно-генетических методов. Достоверность полученных результатов подтверждается статистической обработкой. Выводы, сделанные на основе полученных результатов, не вызывают сомнений.

Научная новизна заключается в следующем: из различных видов культурных растений были выделены эндофитные бактерии, установлена зависимость между способностью растений к синтезу соединений, закупоривающих сосуды, и количеством эндофитов. Показано отличие между эндофитными и неэндофитными микроорганизмами по способу их проникновения в растение. Автор подчеркивает, что на основе полученных им результатов можно расширить определение термина «эндофиты», как бактерии, способные жить внутри растений, проникая в них без повреждений и без помощи других микроорганизмов. Охарактеризована антагонистическая активность выделенных штаммов по отношению друг к другу и к фитопатогенным грибам. Показано, что проявление антагонизма в исследованиях *in vitro* не обязательно влияет на плотность их популяций *in planta*. Изучено влияние оксикоричных кислот на размножение и подвижность эндофитных штаммов *B.subtilis*. Показана способность штамма *B.subtilis* 26Д разрушать феруловую кислоту. У исследуемых микроорганизмов выявлена способность секретировать РНКазы в среду культивирования, что позволяет использовать эти бактерии для борьбы с вирусами растений. Показано, что эндофиты, в частности

B.subtilis 26Д, могут использоваться как модифицированные вектора для повышения устойчивости растений к вредным организмам, включая насекомые-вредители.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. Обоснованность научных результатов и выводов базируется на обширном экспериментальном материале, полученном автором в собственных исследованиях. Научные положения и выводы основаны на анализе результатов собственного исследования, а также на изучении и анализе фундаментальных и прикладных научных работ отечественных и зарубежных авторов. Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам и согласуются с основными результатами проведенного исследования.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций. Автором получены новые данные о свойствах эндофитных бактерий. Показана их способность к кооперации для проникновения в растительные ткани без механических повреждений. Предложена гипотеза участия оксикоричных кислот в колонизации органов и тканей растения эндофитными бактериями. Данные, полученные Сарваровой Е. Р., могут стать основой для разработки новых биопрепаратов на основе эндофитных микроорганизмов. Важным результатом является экспериментальное обоснование для разработки препарата микроорганизмов-продуцентов РНКаз для борьбы с вирусами растений. Создан и депонирован в коллекцию ФГБНУ ВНИИСХМ РАН модифицированный штамм *B. subtilis* 26DCryChS, обладающий инсектицидной активностью.

Структура и содержание диссертации, ее завершенность. Диссертационная работа носит завершенный характер, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, пяти глав собственных результатов, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 124 страницах машинописного текста, иллюстрирована 21 таблицами, и 12 рисунками. Список использованной литературы включает 212 наименований, из которых 204 зарубежные источники.

Во введении представлена актуальность темы, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности, апробация, публикации, объем и структура диссертации, ее связь с научными программами ИБГ УФИЦ РАН.

Первая глава содержит обзор литературы по эндофитным микроорганизмам, их способу проникновения, биологической активности и влиянию на растение. Рассматривается вопрос какие микроорганизмы следует относить к эндофитам. Отмечается, что данная группа бактерий перспективны для использования в составе биопрепаратов для растений. Отдельного упоминания заслуживает раздел, посвященный продукции РНКаз, как способу борьбы с вирусами растений. Это связано с отсутствием препаратов, подавляющих вирусные инфекции.

В главе «Материалы и методы» описаны объекты и методы исследования. Следует отметить большой спектр изучаемых объектов как растительного, так и микробного происхождения. Для достижения поставленной цели автор использует микробиологические, биохимические и молекулярно-генетические методы, их выбор обоснован и позволил получить достоверные результаты.

Глава 3 включает результаты собственных исследований и их обсуждение. Она состоит из нескольких разделов.

Раздел 3.1 посвящен выделению эндофитов из разных видов растений, включая овощные, плодовые и дикорастущие культуры. Автор выясняет роль механических повреждений в проникновении бактерий в растительные ткани и сравнивает частоту встречаемости эндофитов у растений, способных выделять экссудат, закупоривающий поврежденный участок (огурец, чистотел, слива), и растений, у которых такая способность отсутствует.

Раздел 3.2. содержит характеристику выделенных штаммов эндофитов. Установлено высокое содержание представителей рода *Bacillus*. Показана роль механических повреждений или коинокуляции с эндофитами в проникновении неэндофитных штаммов бактерий в растения. Данный подход можно использовать для оценки «эндофитности» исследуемых микроорганизмов. Выявлена зависимость

количества эндофитов от возраста растений. В эксперименте с гентамицином установлено снижение содержания эндофитов в листьях петрушки, связанное с распространением антибиотика по сосудистой системе. В этом же разделе автор подчеркивает, что антагонизм между бактериями, обнаруженный в экспериментах *in vitro*, не всегда проявляется при совместном заражении *in vivo*.

В разделе 3.3. рассматривается влияние оксикоричных кислот как одного из компонентов взаимодействия эндофитных бактерий с растениями. Автор оценивает их влияние на рост колоний и размножение двух штаммов эндофитных бацилл. Установлено, что 100 мкг/мл феруловой и кумаровой кислот значительно подавляет рост колонии *B.subtilis* штаммов 26Д и 11ВМ независимо от состава среды и, напротив, способствует увеличению оптической плотности суспензии клеток в жидкой среде LB и подвижности посредством скольжения. Показано, что *B.subtilis* 26D способен к деструкции феруловой кислоты.

Раздел 3.4 посвящен возможности использования эндофитных бактерий, продуцирующих РНКазы, для защиты от вирусов. Авторами установлено широкое распространение РНКазной активности среди эндофитных бактерий. В полевых экспериментах показано уменьшение степени распространения вирусов у растений картофеля, обработанных препаратом, содержащим бактерии с РНКазной активностью.

Раздел 3.5. описывает создание и характеристику рекомбинантного штамма *B.subtilis* 26DCryChS с повышенной инсектицидной активностью.

В заключении отражены наиболее важные достижения диссертационной работы. Выводы, сделанные автором на основании полученных результатов, соответствуют поставленным задачам и подтверждены экспериментальным и теоретическим материалом.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати. По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 8 статей в журналах из списка ВАК, из них 7 статей – индексируемые в базах Web of Science или Scopus.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.

Содержание автореферата полностью отражает основные положения и выводы диссертационной работы.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, оценка научной работы соискателя в целом, замечания по работе, вопросы.

При ознакомлении с диссертационной работой Сарваровой Е. Р. возникли некоторые вопросы и замечания, которые не умаляют ее достоинства и не носят принципиального характера.

1. В разделе статистической обработки стоит привести обоснование применения параметрических критериев. Анализировались ли данные на нормальность распределения и равенство дисперсий?
2. Название раздела 3.2. не совсем соответствует представленному материалу.
3. На странице 66 автор говорит о «популяции эндофитов». При этом термин «популяция» относится только к организмам одного вида.
4. На стр. 67 автор пишет, что *B.subtilis* 26D «быстро достигают верхней части листа, ... ускоряя ток воды по сосудам». Это утверждение не подтверждено экспериментально.
5. Нет предположений о том, почему оксикоричные кислоты снижают размер колоний, но при этом увеличивают количество клеток и их подвижность по типу скольжения.
6. В заключении продолжается обсуждение теоретических предпосылок из литературных источников, что логичнее было бы разместить либо в литературном обзоре, либо в обсуждении результатов.

Заключение. Диссертация Сарваровой Елены Рафисовны «Поиск новых свойств эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* COHN.» является завершенной научно-квалификационной работой и соответствует паспорту научной специальности 03.02.03. «Микробиология».

Диссертационная работа по актуальности, новизне и значимости в полной мере удовлетворяет требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (ред. от 01.10.2018), предъявляемых к кандидатским диссертациям, а ее автор - Сарварова Елена Рафисовна – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 «Микробиология».

Отзыв на диссертацию Е.Р. Сарваровой обсужден и одобрен на семинаре лаборатории растительно-микробных взаимодействий ФГБУ Сибирский институт физиологии и биохимии растений Российской академии наук (протокол № 35 от 29 октября 2021 г).

Сведения об организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук» (СИФИБР СО РАН). Адрес: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, д. 132.

Телефон (3952)426721, факс (3952)510754

E-mail: matmod@sifibr.irk.ru

Заведующий лабораторией
Растительно-микробных взаимодействий
СИФИБР СО РАН

доктор биологических наук
Александровна

Маркова Юлия

Ученый секретарь СИФИБР СО РАН

кандидат биологических наук

Копытина Татьяна Васильевна



Маркова Ю.А., Копытина Т.В.