

## Отзыв

**официального оппонента кандидата биологических наук Мельниковой Дарьи Игоревны на диссертационную работу Нитяговского Николая Николаевича «Активация защитных свойств винограда *Vitis amurensis* Rupr. посредством эндофитных микроорганизмов», представленную в диссертационный совет 99.0.064.02 на базе ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология (биологические науки)**

Работа Н.Н. Нитяговского посвящена анализу биотехнологического потенциала бактериальных и грибных сообществ, ассоциированных с видами и сортами винограда, произрастающего на Дальнем Востоке России. Многочисленные исследования микробных сообществ высших растений показали, что эндофитные микроорганизмы, состоящие в симбиотических или мутуалистических отношениях с организмом хозяина, являются важным источником биоактивных веществ. Метаболиты, продуцируемые эндофитами, повышают устойчивость растений к патогенам и способствуют их росту. Возможность использования эндофитных микроорганизмов в качестве альтернативы химическим удобрениям и пестицидам для повышения урожайности сельскохозяйственных культур является **актуальной темой исследования** последних десятилетий. Виноград, выбранный диссертантом в качестве объекта исследования, является одной из самых популярных и востребованных культур в мире, что подчеркивает актуальность работы.

**Новизна работы** обоснована выбором района исследования, поскольку данные об эндофитных сообществах дикого и культурного винограда на территории Дальнего Востока России практически отсутствуют. Диссертация Н.Н. Нитяговского представляет собой первый комплексный обзор таксономического состава бактериальных и грибных сообществ, ассоциированных с дикими дальневосточными видами винограда *Vitis amurensis* и *Vitis coignetiae*, а также четырьмя сортами культурного винограда, выращиваемого в Приморском крае. Стоит отметить, что работы, совмещающие характеристику бактериальных и грибных сообществ на одном виде растений, проводятся крайне редко. Впервые проведена оценка встречаемости возбудителя милдью *Plasmopara viticola* на дальневосточном винограде и разработана новая методика обнаружения данного возбудителя с помощью ПЦР РВ в растениях без выраженных признаков заболевания. Впервые продемонстрирована способность эндофитных штаммов грибов и бактерий, выделенных из *V. amurensis*, индуцировать синтез стильбенов в культуре клеток данного вида винограда. Кроме того, впервые из *V. amurensis* выделен и охарактеризован бактериальный штамм *Bacillus velezensis* AMR25, обладающей выраженными антагонистическими свойствами по отношению к ряду типичных патогенов винограда. Диссертантом также предложен недорогой и эффективный метод выделения ДНК для высокопроизводительного секвенирования.

**Теоретическая и практическая значимость**, полученных диссертантом результатов, не вызывает вопросов. Данные о таксономическом составе эндофитных сообществ дальневосточного винограда, произрастающего в условиях повышенной влажности и резких перепадов температур, углубляют понимание механизмов защиты растений от неблагоприятных биотических и абиотических факторов. Свойства отдельных культивируемых штаммов эндофитных микроорганизмов

дальневосточного винограда, включающие значительную антибиотическую активность и иммуностимулирующую способность, демонстрируют перспективны для разработки эффективных экологически безопасных технологий растениеводства. И наконец, методологические подходы, разработанные в ходе выполнения работы, могут быть внедрены в системы ранней диагностики болезней винограда.

Диссертационная работа изложена на 148 страницах и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов и списка используемой литературы. Работа иллюстрирована 25 рисунками и содержит 13 таблиц.

Во введении диссертантом обоснована актуальность выбранной темы, обозначены цель и задачи исследования, показаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы основные положения, выносимые на защиту. **Научные положения обоснованы** большим количеством материала, проанализированного в ходе выполнения работы, а также использованием разнообразных методов исследования, позволивших рассмотреть разные аспекты заявленной проблематики.

В первой главе диссертант представляет обзор литературы, в котором освещает народно-хозяйственную значимость винограда и проблемы, связанные с его выращиванием, а также вопросы взаимодействия эндофитных микроорганизмов с растениями. Достаточно подробно раскрыты особенности влияния эндофитов на иммунитет растений и перспективы использования эндофитных микроорганизмов при выращивании винограда.

В главе «Материалы и Методы» перечислены методики, используемые диссертантом для решения поставленных задач. В работе использован широкий «арсенал» методов, начиная от рутинных микробиологических высевов до высокопроизводительного секвенирования и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты представлены в виде главы собственных исследований на 51 странице, их изложение соответствует задачам, поставленным диссертантом. Особенно впечатляют размеры коллекции культур эндофитных микроорганизмов, полученной из винограда видов *V. amurensis* и *V. coignetiae* и насчитывающей более 1500 штаммов. **Достоверность полученных результатов** обеспечивается корректностью использования методов, многократной повторностью экспериментов и их статистической обработкой.

Обсуждение полученных результатов представлено достаточно подробно. При проведении сравнительного анализа полученных и описанных в литературных источниках данных диссертант апеллирует к новейшим исследованиям.

В заключении обобщены полученные результаты и обозначены перспективы их применения. Выводы, в количестве семи, сформулированы в соответствии с поставленными задачами и отражают основные результаты исследования.

Автореферат соответствует содержанию диссертации. Данные, представленные в работе, достаточно полно отражены в 14 публикациях, в том числе в девяти статьях, опубликованных в журналах из списка ВАК РФ. Работа прошла апробацию на международных, всероссийских и региональных конференциях.

### Вопросы к работе и замечания:

1. Выделение ДНК для высокопроизводительного секвенирования в работе осуществлялось двумя способами: с помощью стандартного коммерческого набора и ЦТАБ-спин метода, разработанного диссертантом. По результатам секвенирования было выявлено, что ЦТАБ-спин метод позволяет получить в два раза больше прочтений гена 16S рРНК бактерий по сравнению с коммерческим набором. Количество прочтений при секвенировании участка гена ITS1 рРНК грибов было одинаковым при использовании ДНК, полученной обоими методами. С чем диссертант связывает повышение глубины секвенирования бактериальной ДНК при применении ЦТАБ-спин метода для выделения геномной ДНК, но отсутствие разницы в глубине секвенирования гена ITS1 рРНК грибов при применении любого из двух методов выделения ДНК?
2. В разделах 3.4 и 3.5 главы «Результаты» диссертант приводит сравнительный анализ качественного и количественного состава бактериальных и грибных таксонов в образцах винограда, содержащих патоген *P. viticola* и не содержащих таковой. По данным метагеномного анализа, представленного диссертантом, микробиом винограда значительно отличается в зависимости от вида и места произрастания. Поэтому релевантность группировки образцов винограда на основе присутствия или отсутствия патогена без учета видовой принадлежности и места сбора вызывает сомнения. В связи с этим, сложно утверждать, что те небольшие различия в представленности некоторых таксонов бактерий и грибов, которые диссертанту удалось обнаружить, связаны с наличием или отсутствием патогена.
3. В разделе 3.7 главы «Результаты» диссертант оценивает влияние 13-ти штаммов бактерий и грибов, выделенных из *V. amurensis*, и препаратов на их основе на культуру клеток *V. amurensis*, а именно на синтез стильбенов и рост клеток. Отбор бактериальных и грибных штаммов для анализа был основан на их встречаемости в тканях *V. amurensis*. В работе данные микроорганизмы отнесены к эндофитам. Однако большинство выбранных штаммов микроорганизмов имеют 99-100% сходство с типичными патогенами растений. Более того в следующем разделе для проверки антибиотической активности бактерии *Bacillus velezensis* AMR25 в качестве часто встречающихся патогенов винограда использованы бактериальные штаммы *Erwinia billingiae*, *Pantoea agglomerans*, *Xanthomonas campestris* и штамм гриба *Alternaria tenuissima*, отнесенные ранее к эндофитам. Хотелось бы уточнить критерии, по которым диссертант относит микроорганизмы, упоминаемые в исследовании, к патогенам или эндофитам.
4. Не могу согласиться с утверждением о непригодности большинства существующих методов выделения ДНК из растений для получения образцов для высокопроизводительного секвенирования, выдвинутом диссертантом при обсуждении результатов (стр. 106). Количество публикаций с использованием NGS технологий применительно к растениям в общедоступных базах данных говорит об обратном. Это, однако, не умоляет вклад диссертанта в разработку



