

Отзыв

официального оппонента доктора биологических наук Кулуева Булата Разяповича 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)

Актуальность исследования

Виноград амурский (*Vitis amurensis*) является уникальным представителем реликтовой доледниковой флоры Дальнего Востока, широко используется в России в качестве плодовой культуры, в селекции культивируемых сортов винограда и в декоративном садоводстве благодаря своей наибольшей морозостойкости среди представителей рода *Vitis* L. К тому же виноград является источником ряда ценных вторичных метаболитов, прежде всего стильбенов, выполняющих в растениях защитную функцию и имеющих противовоспалительное, нейропротекторное и другие полезные свойства для человека. Поэтому биохимические и биотехнологические исследования *V. amurensis* представляют актуальность. Важное значение для роста, продуктивности и устойчивости культивируемых растений имеет грибной и бактериальный состав микробиома эндофитов, который может быть выявлен с использованием методов микробиологии и метагеномики. Полученные в этой области знания могут быть использованы при разработке биопрепаратов и методов защиты виноградной лозы от многочисленных патогенов. При этом большой интерес представляет разработка методов диагностики наличия тех или иных фитопатогенов, а также технологий выделения ДНК для метагеномных исследований. Актуальными являются работы по идентификации генов эндофитов, участвующих в биосинтезе веществ, действующих против бактериальных и грибковых патогенов, что с наибольшей эффективностью можно делать с использованием полногеномных технологий и биоинформатической обработки полученных данных. Эндофиты, выделенные из дикорастущего винограда *V. amurensis*, могут индуцировать биосинтез фармакологически ценных стильбенов у винограда, которые повышают его защитные свойства. Более того, выявленные эндофиты винограда могут быть использованы в биотехнологических целях для повышения продукции стильбенов. Диссертационная работа Н.Н. Нитяговского

направлена на комплексное исследование эндофитного микробиома и подходов для активации защитных свойств *V. amurensis*.

Структура диссертационной работы

Диссертация Нитяговского Н.Н. изложена на 148 страницах текста, состоит из Введения, главы «Обзор литературы», главы «Материалы и методы», главы «Результаты» и главы «Обсуждение», Заключения, Выводов и Списка литературы. Работа иллюстрирована 25 рисунками и содержит 13 таблиц. Список литературы насчитывает 223 наименования.

Во введении Н.Н. Нитяговский дает обоснование актуальности выбранной темы, четко определяет цель работы и формулирует задачи, необходимые для достижения поставленной цели, приводит положения, выносимые на защиту, дает авторскую оценку научной новизны и практической значимости выполненной научно-исследовательской работы. Диссертационная работа характеризуется высоким уровнем личного вклада соискателя во всех проведенных экспериментальных работах. Основные результаты были получены лично автором. Диссертационная работа прошла апробацию на 6 российских и международных научных конференциях, результаты исследования изложены в 14 публикациях, из которых 9 – статьи в журналах из списка ВАК. Весьма примечательной и положительной стороной работы является то, что результаты исследования опубликованы в высокорейтинговых журналах, к примеру, это журналы *Plants*, *Прикладная биохимия и микробиология*, *Horticulturae*, *Microorganisms*.

В литературном обзоре диссертант подробно освещает современное состояние изучаемой проблемы. Первая часть обзора литературы посвящена описанию народно-хозяйственного значения винограда. Далее дается подробная информация об основных возбудителях болезней и методах защиты винограда от этих болезней. Следующий параграф обзора литературы посвящен особенностям колонизации эндофитных микроорганизмов и иммунного ответа растений. Важной частью первой главы также является информация о благоприятном воздействии эндофитов на растения и об эндофитах винограда, оказывающих защитный эффект.

Обзор литературы очень подробный, написан понятным языком, содержит много современной научной информации и может быть рекомендован для использования в учебном процессе у студентов биологических специальностей. При

прочтении обзора формируется общее представление об известной информации о фитопатогенах и эндофитах винограда и других растений, а также путях комплексного благоприятного воздействия эндофитов на виноград.

Н.Н. Нитяговский провел весьма значительную аналитическую работу с большим числом литературных данных, в том числе опубликованных за последние 5 лет, которые включены в список цитированной литературы. Обзор литературы непосредственно связан с предметом исследований и в нем достаточно полно отражены современные тенденции исследований в области растительно-микробных взаимодействий как симбиотического, так и патогенного характера. При прочтении обзора литературы возникает понимание научной новизны и практической значимости диссертационной работы. В целом ознакомление с обзором литературы подводит читателя к существованию большого числа вопросов и проблем в рассматриваемой области, на решение которых и была направлена диссертационная работа Н.Н. Нитяговского.

В главе «Материалы и методы» приведена довольно подробная характеристика объектов исследования и описание всех использованных в ходе работы методов. Работа характеризуется использованием современных методов биотехнологии и физико-химической биологии. Положительной особенностью диссертационной работы является широкое использование методов полногеномного секвенирования, а также биоинформатической обработки полученных данных. В главе 2 описываются методы выделения и анализа нуклеиновых кислот, количественная ПЦР в реальном времени (в том числе с обратной транскрипцией), высокоэффективная жидкостная хроматография, а также методы микробиологии. В целом, протоколы в главе «Материалы и методы» описаны достаточно подробно и позволяют другим исследователям повторить эти эксперименты.

Самая большая глава диссертационной работы посвящена описанию результатов исследования. Первая часть главы 3 посвящена описанию результатов разработки метода выделения ДНК для метагеномного анализа. Далее следует параграф, посвященный исследованиям состава и структуры эндофитных бактерий и грибов винограда по результатам высокопроизводительного секвенирования. Затем описываются работы по выявлению возбудителя ложной мучнистой росы в винограде, а далее в главе 2 также дана информация о разработанном автором методе количественного анализа ПЦР РВ по ITS-последовательности для выявления *Plasmopara viticola*. В следующем параграфе приведены результаты сравнительного

анализа состава эндофитов в образцах винограда, пораженных *P. viticola*. Далее следуют работы по влиянию основных эндофитов винограда и препаратов на их основе на культуру клеток *Vitis amurensis*, а также описываются антипатогенные свойства *Bacillus velezensis* AMR25. Последний параграф главы 3 посвящен описанию экспериментов по полногеномному секвенированию и аннотации генома эндофитной бактерии винограда *B. velezensis* AMR25.

После главы 3 дается обсуждение по всем полученным в ходе работы результатам исследования с привлечением литературных данных. Также в обсуждении говорится об актуальности работы, кратко перечисляются самые важные результаты исследования, характеризующиеся научной новизной, и дается авторская оценка практической значимости проведенной работы. В диссертации также есть краткое заключение, где дается общий вывод по всей проведенной работе.

Выводов приводится 7, сформулированы они четко, непосредственно вытекают из полученных данных и понятны для читателя. Диссертационная работа Н.Н. Нитяговского написана хорошим научным и понятным языком, все экспериментальные данные сведены в таблицы и рисунки и обсуждены с привлечением широкого круга литературных данных. В целом, в тексте допущено очень мало ошибок, текст изложен в логичном порядке и при прочтении возникает четкое убеждение о целостности и завершенности диссертационной работы.

Стоит отдельно отметить основные положительные стороны диссертации. Н.Н. Нитяговскому удалось комплексно охарактеризовать не изученный ранее уникальный микробиом эндофитных бактерий и грибов дикорастущих и культивируемых на Дальнем Востоке сортов винограда. Весьма важен разработанный диссертантом ЦТАБ-спин метод выделения ДНК, который подходит для метагеномного анализа. Секвенирование и аннотация генома *B. velezensis* AMR25 дает большое количество важных данных не только для фундаментальной науки, но и для использования на практике. В целом, проделанная диссертантом работа продвигает современную идею о важности не только эндофитов растений, но и всей микрофлоры проживающей в симбиозе с эукариотическим макроорганизмом и подводит к концепции холобионта. Что касается практической значимости, то полученные автором результаты могут быть использованы при разработке биопрепаратов для защиты винограда от фитопатогенов и методов стимуляции продукции стильбенов.

Научная новизна и практическая значимость полученных результатов

До диссертационного исследования Н.Н. Нитяговского эндофитный микробиом дикорастущих и культивируемых сортов винограда на Дальнем Востоке России оставался не изученным. Также автором впервые проведена работа по оценке встречаемости возбудителя милдью *P. viticola* на винограде Дальнего Востока России. В данной диссертационной работе также разработаны и испытаны новые методы биотехнологии и молекулярной генетики. К примеру, автором разработан эффективный и недорогой метод выделения ДНК для метагеномных исследований, а также разработан новый способ ранней диагностики *P. viticola* на винограде с помощью ПЦР РВ. Автором из амурского винограда выделен штамм эндофитной бактерии *Bacillus velezensis* AMR25, обладающей выраженными антагонистическими свойствами по отношению к некоторым патогенам винограда. Этот штамм может быть предложен для создания биопрепарата для защиты винограда от патогенов.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов диссертационной работы

Использование для исследований современных методов биотехнологии и физико-химической биологии таких как ПЦР в реальном времени, высокопроизводительное секвенирование, высокоэффективная жидкостная хроматография и др., а также методов биоинформатики и статистики подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в работе Н.Н. Нитяговского, а также выносимых на защиту положений и выводов. Во всех исследованиях выборка достаточна, а выбранные методы статистического анализа правильные. Приведенные данные в таблицах и гистограммах позволяют проверить соответствующими методами правильность расчетов, сделанных диссертантом. Автор тщательно проверяет полученные данные, оценивает достоверность различий с использованием стандартных методов статистики. Таким образом, полученные Н.Н. Нитяговским научные результаты и выводы являются обоснованными и достоверными. Следует отметить и то, что основные результаты диссертации Н.Н. Нитяговского опубликованы в высокорейтинговых журналах, а

также апробированы в научных конференциях. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

В ходе чтения к диссертационной работе возникли следующие вопросы:

1. В диссертации среди эндофитных бактерий перечислены представители рода *Agrobacterium*. Действительно ли эти бактерии являются эндофитами в анализируемых образцах?

2. Данные микробиологического высева существенно отличаются от данных метагеномного анализа по количеству обнаруженных родов. С чем это, кроме наличия некультивируемых микроорганизмов, может быть связано?

3. С чем может быть связано отсутствие *P. viticola* во Владивостоке и о. Русский?

4. Стр. 57. «*V. amurensis* характеризуется большей относительной численностью ампликонов таких родов как *Massilia* и *Escherichia-Shigella*». Обнаруживаются ли в группе *Escherichia-Shigella* патогенные для человека бактерии?

Общих замечаний к диссертационной работе нет, можно лишь отметить несколько замечаний редакторского характера:

1. Стр. 17. «нейродегенеративный» – нейродегенеративный

2. Стр. 21. «в пределах 15-25 °С» - в пределах 15-25 °С

3. Стр. 39. «для анализа дальнейшего анализа» – повтор

4. «ГенБанк» – лучше писать GenBank

5. Стр. 65. «Была проанализирована встречаемость» - Была проанализирована встречаемость

6. Стр. 98. «AMR25 показаны на Рисунок 21» - AMR25 показаны на Рисунке 21

7. Стр. 121. «также были обнаружены, как упоминалось ранее, была обнаружены гены биосинтеза» - повтор, неправильное окончание.

Сделанные в отзыве замечания не влияют на актуальность, новизну, практическую значимость и фундаментальный характер полученных выводов диссертационной работы.

Заключение

Диссертационное исследование Н.Н. Нитяговского «Активация защитных свойств винограда *Vitis amurensis* Rupr. посредством эндофитных микроорганизмов», представленное на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология (биологические науки) является законченной научно-квалификационной работой, в которой получены данные о составе микробиома винограда, о распространении *P. viticola*, об эндофитах амурского винограда и возможности их использования на практике. По актуальности темы, научному уровню, теоретической и практической значимости результатов диссертация отвечает требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018 с изм. от 26.05.2020), а ее автор Нитяговский Николай Николаевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология (биологические науки).

доктор биологических наук
по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология,
ведущий научный сотрудник лаборатории геномики растений
Института биохимии и генетики – обособленного структурного
подразделения Федерального государственного бюджетного
научного учреждения Уфимского федерального исследовательского
центра Российской академии наук

Булат Разяпович Кулеув

27.12.2024 г.

Адрес: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71
ibg.anrb.ru, e-mail: molgen@anrb.ru, kuluev@bk.ru
Тел.: +7 (347) 2356100, +7 (347) 2356088

Подпись Кулеува Б.Р. заверяю,
ио директора ИБГ УФИЦ РАН



Карунас А.С.

Сведения об оппоненте

по диссертационной работе **Нитяговского Николая Николаевича**
на тему «Активация защитных свойств винограда *Vitis amurensis* RUPR.
посредством эндофитных микроорганизмов»,
представленной на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности
1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

Фамилия Отчество оппонента	Имя	Кулуев Булат Разяпович
Шифр наименование специальностей, по которым защищена диссертация	и	03.01.03 – молекулярная биология
Ученая степень и отрасль науки	и	Доктор биологических наук
Ученое звание		нет
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента		Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
Занимаемая должность		Ведущий научный сотрудник лаборатории геномики растений
Почтовый индекс, адрес		450054, г. Уфа, Проспект октября, 71
Телефон		+7 (347) 235-61-00
Адрес электронной почты		kuluev@bk.ru
Список основных публикаций официального оппонента по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)		1. Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Kuluev B.R. , Kiryanova O.Y., Gumerova G.R., Knyazev A.V., Vershinina Z.R., Mikhailova E.V., Chemeris D.A., Matniyazov R.T., Baimiev A.K., Gubaidullin I.M., Baimiev A.K., Chemeris A.V. Design of guide RNA for CRISPR/Cas plant genome editing // Molekuliarnaia biologii. 2020. Vol. 54, No. 1, P. 29–50. 2. Vysotskaya L., Akhiyarova G., Feoktistova A., Akhtyamova Z., Korobova A., Ivanov I., Dodd I., Kuluev B. , Kudoyarova G. Effects of phosphate shortage on root growth and hormone content of barley

depend on capacity of the roots to accumulate ABA // Plants. 2020. Vol. 9, No. 12, 1722.

Mikhaylova E.V., Artyukhin A., Musin K., Panfilova M., Gumerova G., **Kuluev B.** The first report on the induction of hairy roots in *Trapa natans*, a unique aquatic plant with photosynthesizing roots // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2021. Vol. 144, No. 2, P. 485–490.

3. Musin K.G., Fedyaev V.V., **Kuluev B.R.** State of antioxidant system and long-term storage of tobacco hairy roots with constitutive expression of glutathione-S-transferase gene *ATGSTF11* // Russian Journal of Plant Physiology. 2021. Vol. 68, P. 641–651.

4. Korobova A., **Kuluev B.**, Möhlmann T., Veselov D., Kudoyarova G. Limitation of cytokinin export to the shoots by nucleoside transporter ENT3 and its linkage with root elongation in *Arabidopsis* // Cells. 2021. Vol. 10, No. 2, 350.

5. Mikhaylova E., Khusnutdinov E., Shein M.Y., Alekseev V.Y., Nikonorov Y., **Kuluev B.** The role of the *GSTF11* gene in resistance to powdery mildew infection and cold stress // Plants. 2021. Vol. 10, No. 12, 2729.

6. **Kuluev B.R.**, Mikhailova E.V., Kuluev A.R., Galimova A.A., Zaikina E.A., Khlestkina E.K. Genome editing in species of the tribe Triticeae with the CRISPR/Cas system // Molekuliarnaia biologiya. 2022. Vol. 56, No. 6, P. 949–968.

7. Lastochkina O., Ivanov S., Petrova S., Garshina D., Lubyanova A., Yuldashev R., **Kuluev B.**, Zaikina E., Maslennikova D., Allagulova C., Avtushenko I., Yakupova A., Farkhutdinov R. Role of endogenous salicylic acid as a hormonal intermediate in the bacterial endophyte *Bacillus subtilis*-induced protection of wheat genotypes contrasting in drought susceptibility under dehydration // Plants. 2022. Vol. 11, No. 23, 3365.

8. Sharipova G., Ivanov R., **Kuluev B.**, Akhiyarova G., Veselov D., Kudoyarova G. Effects of constitutive expression of barley aquaporin gene, *HVPIP2;1*, on water relations and growth of tobacco plants under normal conditions and salinity and their linkage with capacity for osmotic adjustment // Russian Journal of Plant Physiology. 2022. Vol. 69, No. 1, P. 10.

9. Musin K.G., Gumerova G.R., Baimukhametova E.A., **Kuluev B.R.** Growth and stress resistance of tobacco

