

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(СИФИБР СО РАН)

664033, Иркутск-33, а/я 317. Для телеграмм: Иркутск-33, Физиология.  
Тел. 42-67-21, Факс: (3952) 51-07-54, ИНН 3812010449  
E-mail: matmod@sifibr.irk.ru

От 9.01.2025 / 277-04-60/3



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор СИФИБР СО РАН  
д.б.н.

Воронин Виктор Иванович

9 января 2025 г.

**Отзыв ведущей организации на диссертационную работу**

Нитяговского Николая Николаевича

"Активация защитных свойств винограда *Vitis amurensis* Rupr. посредством эндофитных микроорганизмов", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. - Биотехнология (биологические науки)

**Актуальность темы выполненной работы**

Одним из важнейших направлений современной биотехнологии является разработка новых методов повышения устойчивости растений к повреждающим факторам окружающей среды как биотической, так и абиотической природы, а также внедрение эффективных подходов по повышению продуктивности растений, включая использование их как биореакторов для наработки ценных метаболитов. Особенно актуальной данная проблематика становится в условиях растущего населения планеты, изменяющегося климата и напряженной геополитической обстановки. Среди огромного разнообразия продовольственных растений виноград занимает одну из лидирующих позиций и является востребованной и экономически-

важной агрокультурой. Виноград является сырьем для производства различных алкогольных напитков, сока, желе, уксуса, масла, изюма и других продуктов. Кроме того, непосредственно сами растения винограда используются в декоративных целях при проведении ландшафтно-дизайнерских работ. Несмотря на то, что на территории нашей страны мест для его эффективного выращивания не так много, актуальность и количество работ по изучению винограда с целью повышения его потребительских свойств не снижается, а только растет. Запущен целый ряд государственных программ по поддержке виноградарства, восстановлению виноградников и разработке новых сортов винограда. С развитием новых методов молекулярной биологии, включая геномные и постгеномные технологии, появилась возможность проводить исследования винограда на новом, ранее недоступном уровне. Данное диссертационное исследование основано на применении современных молекулярно-генетических подходов для изучения микробиома винограда и его биотехнологического потенциала. Целью работы автор определил изучение состава эндофитных бактерий и грибов винограда, произрастающего на Дальнем Востоке России, в том числе для оценки встречаемости основных патогенов винограда и их раннего выявления, с перспективой создания биопрепаратов на основе эндофитов, активирующих защитные свойства винограда. Данная тематика, несомненно, является актуальной и перспективной, что подтверждается в обзоре литературы, который приводит автор, а также растущим интересом мирового сообщества к растительно-микробным взаимодействиям и технологиям, которые могут быть разработаны при глубоком изучении механизмов, лежащих в их основе. Особенностью работы является выбор объектов исследования – двух видов винограда, произрастающих на Дальнем Востоке нашей страны и имеющих ярко выраженные эколого-географические характеристики. Виноград *Vitis amurensis* является потенциальным источником «полезных» эндофитов, которые могут использоваться для улучшения роста и повышения устойчивости к стрессовым воздействиям у винограда и других растений.

## Новизна исследования и его научная значимость

В работе впервые из *Vitis amurensis* был выделен штамм эндофитной бактерии *Bacillus velezensis*, обладающий выраженными антагонистическими свойствами по отношению к некоторым патогенам винограда. Впервые изучен эндофитный микробиом виноградов *V. amurensis* и *V. coignetiae*. Была оценена встречаемость возбудителя милдью *P. viticola* на винограде Дальнего Востока России, а также получена информация о потенциальных микроорганизмах-антагонистах *P. viticola*. Разработаны праймеры для ранней диагностики *P. viticola* в винограде с помощью ПЦР. Впервые штаммы эндофитных грибов и бактерий *V. amurensis* применены для индукции биосинтеза стильбенов и активации защитных свойств винограда. Результаты достоверны и получены на большом экспериментальном материале. Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием как классических, так и самых современных подходов и методов.

Научная значимость полученных результатов заключается в том, что в ходе исследований показано, что исследуемые молекулярные и клеточные реакции соответствуют наблюдаемым биохимическим и физиологическим откликам. Это еще один шаг в комплексном понимании механизмов реакции и защиты организмов от стрессовых воздействий. Результаты работы могут найти применение в сельском хозяйстве как для активации защитных свойств растений и повышения качества биохимического состава плодов, так и для защиты от широко распространенных инфекций винограда и других растений. Данные, полученные в ходе метагеномного анализа эндофитных бактерий и грибов винограда, могут быть использованы для создания технологий инженерии микробных сообществ с целью повышения устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессовым факторам.

Диссертационное исследование также носит фундаментально-теоретический характер и расширяет уже имеющиеся представления о растительно-микробных взаимодействиях и механизмах активации защитных систем растительного организма в ответ на стимулирующее воздействие продуктов метаболизма эндофитов.

## **Общая характеристика работы**

Диссертационная работа изложена на 148 страницах машинописного текста, состоит из введения, содержащего цель и задачи исследования, четырех глав (Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение результатов), а также заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Основные результаты проиллюстрированы 25 рисунками и отражены в 13 таблицах. Список литературы состоит из 223 источников, из них 9 на русском и 214 на английском языке.

Основное содержание работы. Во введении автором представлено обоснование актуальности, новизны и научной значимости исследования.

В главе «Обзор литературы» приводится описание народно-хозяйственного значения винограда, дается характеристика основных возбудителей болезней винограда и методов его защиты от основных фитопатогенов. Также автор подробно описывает особенности иммунного ответа растений в ответ на колонизацию эндوفитными микроорганизмами, а также положительные эффекты, которые получает растение от населяющих его эндوفитов. Исходя из числа проанализированных литературных источников можно заключить, что диссертант хорошо ориентируется в изучаемом им вопросе.

В главе «Материалы и методы» приводятся описание изучаемых видов винограда, особенности отбора экспериментального материала и подробное описание использованных методов. В работе автор использовал широкий набор классических экспериментальных и современных аналитических методов, что, несомненно, является достоинством работы. Автор приводит описание статистических подходов, использованных при анализе данных, что позволяет говорить о достоверности полученных в работе результатов.

Главы 3 и 4 посвящены описанию полученных результатов и их обсуждению.

Заключительной частью диссертационной работы являются выводы, обобщающие результаты проведенной работы.

Следует отметить, что в работе представлено большое количество экспериментального материала. Диссертант проводит глубокий анализ полученных

данных и убедительно обосновывает полученные результаты. Сформулированные автором выводы полностью соответствуют цели и задачам исследования.

Результаты исследований прошли апробацию на всероссийских и международных конференциях и полностью отражены в рецензируемых научных изданиях. По теме диссертации Нитяговского Н.Н. опубликовано 9 статей в журналах рекомендованных ВАК (7 в высокорейтинговых зарубежных журналах WOS и 2 в отечественном журнале «Прикладная биохимия и микробиология», входящим в «Белый список»).

### **Вопросы и замечания к работе**

1) С чем автор связывает отсутствие *P. viticola* в образцах винограда, собранного вблизи г. Владивосток, на о. Русский и в с. Ивановка?

2) Хотелось бы более подробно узнать про методику отбора растительного материала, а именно как стерилизовались инструменты в полевых условиях между отбором образцов и какие ПАВ использовались при поверхностной стерилизации эксплантов (автор не приводит эту информацию в методах)?

3) Довольно удивительно, что для растворения выделенной ДНК использовалась дистиллированная вода. Обычно при выделении нуклеиновых кислот используют воду свободную от ДНКаз и РНКаз. Также не совсем понятно почему качество выделенной ДНК оценивалось только спектрофотометрически. Для таких серьезных процедур как секвенирование метагенома следует использовать более чувствительные методы определения качества выделенной ДНК, например с помощью приборов типа Bioanalyzer или TapeStation. Спектрофотометр способен оценить только количество и частично чистоту препарата ДНК, но не его качество.

4) В тексте диссертации встречаются повторы целых предложений в разных главах, причем некоторые предложения повторяются до 3-х раз.

5) Автор пишет о том, что терруар и микробиом могут и влияют на вкус вина, получаемого из винограда. Было бы интересно поискать корреляции между выявленным составом эндофитов винограда и вкусом вина, которое из него

получают, в сравнении с другими регионами. Такая работа может быть сделана в будущих исследованиях.

6) Автор приводит стоимость одной ПЦР реакции и делает вывод о том, что использование ПЦР будет дешевле, чем превентивная обработка посадок винограда химикатами. Но при этом не приводятся сравнительные затраты на эти обработки. Если посчитать, что с каждой лозы нужно отобрать материал и поставить ПЦР, а в случае положительного сигнала все равно прибегнуть к обработке посадок реагентами, то молекулярный подход может оказаться дороже. Конечно, использование ПЦР для детекции патогенов нельзя исключать и этот метод иногда оправдан, но при этом нельзя забывать о классических подходах. Также хочется порекомендовать автору рассмотреть такой подход как Direct PCR, который не требует выделения ДНК, а в качестве образца используется непосредственно растительная ткань. Такой подход позволит еще удешевить процедуру ПЦР.

7) Стресс – это ответная реакция организма, поэтому употребление такого словосочетания как «биотические и абиотические стрессы» некорректно, следует использовать выражения «биотические и абиотические стрессовые воздействия» или «биотические и абиотические стрессовые факторы».

8) Что часть выводов по работе полностью дублируют результаты. Выводы должны описывать выявленные закономерности, паттерны или взаимосвязи. Выводы № 3 и 4 сложно назвать выводами, скорее это констатация факта. При всей важности работы по созданию коллекций микроорганизмов, это не является выводом из работы, скорее сопутствующий результат.

9) Также автор излишне сосредотачивается на красителе SYBR Green при описании разработанного метода детекции *P. viticola* в образцах винограда методом ПЦР. Здесь правильнее будет говорить именно о подобранных праймерах, которые скорее всего будут работать и с другими реактивами для ПЦР.

10) В тексте диссертации отсутствует описание ключевых методов, использованных в работе, а дана лишь ссылка на ранее опубликованные работы. Это усложняет чтение диссертации и хотелось бы видеть полное описание методов.

## Заключение

В целом текст диссертации хорошо выверен и практически не содержит ошибок, исключая редкие опечатки, пунктуационные ошибки и использование научного сленга, часто являющегося прямым переводом иностранных терминов вошедших в обиход молекулярных биологов.

Отмеченные недостатки не снижают общего впечатление о диссертационной работе как квалифицированном научном труде высокого уровня. Все приведенные замечания носят рекомендательный и дискуссионный характер и могут быть исправлены или реализованы в последующей научной деятельности соискателя. Автореферат диссертации соответствует ее содержанию.

Считаем целесообразным продолжить работу по дальнейшему выявлению кандидатных генов эндофитных грибов и бактерий винограда, участвующих в повышении устойчивости растений к повреждающим абиотическим и биотическим факторам среды, а также в активации процессов накопления полезных метаболитов. Представляют интерес дальнейшие исследования, связанные с использованием полученной в результате выполнения данной диссертационной работы информации о кандидатных генах в работах по генетической трансформации или генетическому редактированию других важных для сельского хозяйства растений с целью повышения их продуктивности и устойчивости.

Диссертация представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу, на актуальную тему. Новые научные результаты, полученные диссертантом, имеют существенное значение для понимания механизмов растительно-микробных взаимодействий, а также для разработки новых методик как защиты растений, так и повышения их продуктивности и хозяйственной ценности. Выводы работы достаточно обоснованы. Работа отвечает требованиям Положения о порядке присуждения научным и научно-педагогическим работникам ученых степеней, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. - Биотехнология (биологические науки).

Диссертационная работа Нитяговского Николая Николаевича и отзыв на нее были обсуждены на заседании лаборатории физиологической генетики СИФИБР СО РАН «9» января 2025 г., протокол № 1.

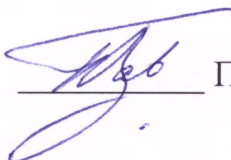
Председатель заседания  
доктор биологических наук по  
специальности 03.01.05 –  
«Физиология и биохимия  
растений», главный научный  
сотрудник лаб. физиологической  
генетики СИФИБР СО РАН, и.о.  
заведующего лабораторией

  
Грабельных О.И.

Сведения о составителе отзыва:

кандидат биологических наук по специальности 03.02.08 – «Экология» (биологические науки), старший научный сотрудник лаборатории физиологической генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (СИФИБР СО РАН)

«9» января 2025 г.

  
Павличенко Василий Валерьевич

Адрес организации: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132.

Тел.: +7 (3952) 42-67-21, факс: +7 (3952) 51-07-54, e-mail: [matmod@sifibr.irk.ru](mailto:matmod@sifibr.irk.ru), сайт организации: [www.sifibr.irk.ru](http://www.sifibr.irk.ru)

E-mail: [vpavlichenko@gmail.com](mailto:vpavlichenko@gmail.com); Тел.: +7 950 411 90 14

  
Подпись г.н.с. лаб. физиологической генетики, г.б.н.  
О.И. Грабельных и ст.н.с. лаб. физиологической генетики,  
к.б.н. В.В. Павличенко  
Главный секретарь СИФИБР СО РАН  
Т.В. Колоткина  
09.01.2025г.

## СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

В диссертационный совет 99.0.064.02 по специальности: 1.5.6.  
Биотехнология (биологические науки) при ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН  
и ФГАОУ ВО "Дальневосточный федеральный университет"  
(690022, г. Владивосток, проспект Столетия Владивостоку 159/1)

В аттестационное дело  
Нитяговского Николая Николаевича

Полное название ведущей организации	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание руководителя организации	Воронин Виктор Иванович, доктор биологических наук
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание лица, утвердившего отзыв ведущей организации	Воронин Виктор Иванович, доктор биологических наук
Название подразделения, в котором подготовлен отзыв	Лаборатория физиологической генетики
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание лица, должность сотрудника, составившего отзыв ведущей организации	Павличенко Василий Валерьевич, к.б.н., ст.научный сотрудник
Адрес ведущей организации	
Индекс	664033
Объект	СИФИБР СО РАН
Город	Иркутск
Улица	Лермонтова
Дом	132, а/я 317
Телефон	(3952) 42-67-21
e-mail	matmod@sifibr.irk.ru
Web-сайт	http://sifibr.irk.ru

Ведущая организация подтверждает, что соискатель не является ее сотрудником и не имеет научных работ по теме диссертации подготовленных на базе ведущей организации или в соавторстве с ее сотрудниками.

Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации за последние 5 лет:

1. **Pavlichenko V.V., Protopopova M.V.** Obtaining and primary phenotypic characterization of Berlin poplar transformed by *AtGA20ox1* gene // Russian Journal of Plant Physiology. – 2024. – V. 71:58. – P. 1-14.

2. **Pavlichenko V.V.**, Protopopova M.V. Simplified Method for *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation of *Populus x berolinensis* K. Koch // Methods and protocols. - 2024. – V. 7(1):12. – P. 1-13.
3. **Pavlichenko V.V.**, Protopopova M.V. Selection of the optimal concentration of indole-3-butyric acid (IBA) in the nutrient medium for effective micropropagation of *Populus berolinensis* // E3S Web of Conferences. 2023. – V. 463, 01032. – P. 1-6.
4. Protopopova M., **Pavlichenko V.**, Chepinoga V., Gnutikov A., Adelshin R. *Waldsteinia* within *Geum* s.l. (Rosaceae): main aspects of phylogeny and speciation history // Diversity. 2023. – V. 15 (479). – P. 1-30.
5. Protopopova M., Sandanov D., **Pavlichenko V.**, Selyutina I., Stepanov N. The curious case of *Fritillaria sonnikovae* (Liliaceae) in South Siberia: new insights into its origin and phylogeny // Diversity. 2023. – V. 15 (193). – P. 1-21.
6. Protopopova M., **Pavlichenko V.** *Eranthis* Salisb. (Ranunculaceae) in South Siberia: insights into phylogeography and taxonomy // Diversity. 2022. – V. 14 (779). – P. 1-19.
7. Chepinoga V.V., Protopopova M.V., **Pavlichenko V.V.**, Dudov S.V. Habitat Distribution Patterns of Nemoral Relict Plant Species on the Khamar-Daban Ridge (the South of Eastern Siberia) according to Grid Mapping Data // Russian Journal of Ecology. 2021. – V. 52 (3). – P. 212-222.
8. **Pavlichenko V.V.**, Protopopova M.V. Kanamycin application features for the selective screening of genetically modified *Populus berolinensis* // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2021. V. 839: 042020. – P. 1-7.
9. Protopopova M.V., **Pavlichenko V.V.**, Luckenbach T. Changes of cellular stress response related *hsp70* and *abcb1* transcript and Hsp70 protein levels in Siberian freshwater amphipods upon exposure to cadmium chloride in the lethal concentration range // PeerJ. 2020. – V.8: e8635. – P. 1-24.
10. **Pavlichenko V.V.**, Protopopova M.V., Voinikov V.K. A comparative study of the various light sources regenerative potential using *Populus berolinensis* root explants as an example // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2020. – V. 548 (062093). – P. 1-6.

Директор СИФИБР СО РАН,  
д.б.н.



В.И. Воронин



\_\_\_\_\_ 2024 г.