

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Цавкеловой Елены Аркадьевны на соискание ученой степени доктора биологических наук «СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ЭПИФИТНЫХ ОРХИДЕЙ: БИОРАЗНООБРАЗИЕ, РОЛЬ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ АССОЦИАТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ» по специальности 03.02.03 – микробиология; 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Растение, как целостный организм, является центром формирования специализированных микробных сообществ (Красильников, 1958), определяет их таксономический состав и пространственно-функциональную организацию, а все стадии онтогенеза растения, начиная от прорастания семян до разложения остатков связаны с деятельностью бактерий и грибов. В современной научной литературе органы растения предложено рассматривать как совокупность специализированных экологических ниш микроорганизмов (Добровольская, 2002; Лобакова, 2004): филлосферу, ризосферу и ризоплану, гемисферу и др. При этом установлено, что распределение микроорганизмов на/в растениях носит микроразнообразный характер, и существенно отличается по видовому составу, обилию микроорганизмов и их функциям в пределах одного и того же растения (Лобакова, 2004).

Представленная Цавкеловой Е.А. диссертационная работа значительно расширяет имеющиеся к настоящему моменту сведения по видовому разнообразию и в понимание особенностей функционирования таких микробных сообществ в отношении малоизученных объектов - эпифитных орхидей. Эта работа также имеет явно выраженную прикладную направленность в ряде решения биотехнологических задач, в частности разработки методологии этих растительно-микробных отношений для семенного размножения орхидей в ко-культуре со штаммами RGPB.

Целью работы Цавкеловой Е.А. является структурно-функциональный анализ ассоциативных микробных сообществ эпифитных орхидей с изучением механизмов микробно-растительных взаимоотношений, направленных на формирование и эффективное взаимодействие между партнёрами, в том числе для семенного размножения этих растений.

Задачи работы, определенные автором, проистекают из научно-методического обоснования особенностей взаимодействия ассоциативных и эндофитных бактерий и грибов с эпифитными и лекарственными орхидеями и изучения фундаментальных и прикладных характеристик этих растительно-микробных отношений. Их можно поделить на три крупных независимых блока: **Первый блок задач** включает исследование состава микробных сообществ оранжерейных и дикорастущих эпифитных орхидей, в том числе сравнительный анализ фитомикробиома на примере *Dendrobium moschatum* с использованием традиционных техник и современных методов профилирования микробных сообществ с выявлением доминирующих популяций бактерий в ризоплане и филлоплане растения и стратегии взаимодействия ассоциативных микроорганизмов с семенами и генеративно-зрелыми растениями. **Второй блок задач** посвящен характеристике функциональной активности наиболее типичных ассоциативных микромицетов – представителей родов *Trichoderma* и *Fusarium* и рассмотреть участие и роль этих грибов в растительно-микробных ассоциациях. Определить основные пути образования и регуляции биосинтеза у грибов - микробных стимуляторов роста растений, а также роль ауксинов и гиббереллинов во взаимодействии между растением-хозяином и колонизирующими его грибами и бактериями. Оценить потенциал ассоциативных грибов для их использования в биотехнологии на примере целлюлазной активности *Trichoderma*, способности к биосинтезу гиббереллинов *Fusarium*. **Третий блок** акцентирует внимание на рост-стимулирующей активности бактерий

продуцентов индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). На основе биосинтеза ИУК провести селекцию и изучить условия, видоспецифичность и эффективность инокуляции семян орхидей аборигенными и нерезидентными культурами бактерий для метода семенного размножения орхидей.

Научная новизна и практическая значимость работы

Существенная новизна проведенных диссертантом исследований не вызывает сомнений и имеет не только прикладную, но и фундаментальную значимость с точки зрения понимания механизмов микробно-растительных взаимодействий эпифитных орхидей, биоразнообразия их ассоциативных микробных сообществ.

Автором впервые на молекулярном уровне исследованы механизмы образования ауксинов по индолил-3-ацетамидному пути у грибов, принадлежащих к роду *Fusarium*, выявлены различия в биосинтезе и регуляции биосинтеза ауксинов и гиббереллинов у *F. proliferatum* ET1 в сравнении с другими фитопатогенными грибами этого рода, что может характеризовать и определять стратегии взаимодействия представителей *Fusarium* с растениями. Установлено, что механизм регуляции экспрессии генов, отвечающих за биосинтез гиббереллинов связан с участием общего регуляторного механизма транскрипции с помощью фактора транскрипции AreA. Показана эволюционная консервативность регуляторных механизмов биосинтеза гиббереллинов, которая проявляет свою функциональность даже у видов, утеревших частично или полностью способность к биосинтезу этих соединений. Исследованиями Цавкеловой Е.А. показана принципиальная возможность реставрации биосинтеза ГК у *Fusarium oxysporum*, который не относится к комплексу видов *Fusarium* (*Gibberella*) *fujikuroi* и исходно не способен к образованию ГК. После введения всего кластера генов в *F. oxysporum* №1 он полностью возобновил способность к биосинтезу ГК (Tsavkelova, 2016), подтверждая функциональность всех регуляторных механизмов экспрессии генов.

Практическая значимость работы определяется необходимостью сохранения численности и видового биоразнообразия семейства орхидных. Предложенный способ бактеризации семян селективными штаммами RGPB культур позволяет, используя простые питательные среды без добавления дополнительных стимуляторов роста растений, значительно увеличить всхожесть семян орхидей, а также ускорить их развитие. Впервые разработан ряд критериев для отбора эффективных штаммов, подходящих для их использования в ко-культуре семенами орхидей: образование оптимальных (около 20-80 мкг/мл) количеств ИУК, непосредственный контакт клеток RGPB с семенами при бактеризации и отсутствие формирования чрезмерного экзополисахаридного матрикса на высокоуглеводных агаризованных питательных средах, используемых для проращивания семян. Автором установлено, что при разработке технологии бактеризации семян орхидей с помощью селективных аборигенных и нерезидентных культур RGPB – ростстимуляторов необходимо учитывать особенности биологии орхидных растений: мельчайший размер семян, отсутствие эндосперма, необходимость комплексных питательных сред, длительный период прорастания и развития, что накладывает ограничения на выбор RGPB культур ризобактерий.

Автором показаны существенные различия в составе ассоциативных сообществ гетеротрофных бактерий, заселяющих воздушные и субстратные корни эпифитных *Acampe praemorse* и *Dendrobium moschatum* на основании двух методических подходов: традиционно-микробиологического, включающего выделение чистых культур на питательных средах с дальнейшей их идентификацией, а также молекулярно-биологического профилирования сообществ с использованием высокопроизводительного секвенирования (на базе Illumina Miseq).

Доказано, что отсутствие строгой специфичности между орхидеей-хозяином и бактериальными партнерами позволяет широко использовать RGPB для семенного размножения орхидных *in vitro*. Бактеризованные семена не только получают преимущества при прорастании, но и более устойчивы, что повышает адаптационные возможности ювенильных растений при пересадке в субстрат, что необходимо при ре-интродукции орхидей в природу.

К основному биотехнологическому аспекту работы относится разработка технологии бактеризации семян орхидей с помощью селектированных аборигенных и нерезидентных культур RGPB, что позволяет значительно увеличить всхожесть и ускорить развитие растений при их семенном размножении. Помимо этого, важным результатом для экологической биотехнологии является предложенная Цавкеловой Е.А. технологическая схема получения биогаза посредством конверсии биомассы *Anabaena* sp. термофильными сообществами с образованием более 60% кумулятивного метана в составе. Это открывает перспективы для использования биомассы цианобактерий как альтернативного субстрата для получения биотоплива.

Методология и методы исследований

В работе продемонстрированы возможности современных микробиологических, микологических, цитологических и молекулярных методов. Результаты исследований очень подробно обработаны статистически, в том числе с применением методов математической статистики. Полученные диссертантом выводы обоснованы и достоверны, опираются на анализ обширного экспериментального материала и существующую методологическую базу.

Результаты работы имеют значение для решения ряда теоретических фундаментальных вопросов классической микробиологии и молекулярной биологии, а также прикладных биотехнологических задач по поиску субстратов и эффективных подходов к получению альтернативных

источников биотоплива. Среди таких субстратов для сбраживания метаногенным анаэробным сообществом возможность использования биомассы фототрофных микроорганизмов рассматривается как перспективный источник и имеет как свои преимущества за счёт высокой продуктивности биомассы.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.

Структура диссертационной работы Е.А. Цавкеловой написана по традиционному принципу и состоит из: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 432 страницах, содержит 122 рисунка и 42 таблицы. Список литературы включает 1061 источник, из них 165 на русском и 896 на иностранных языках.

В главе 1 приводится детальный обзор, касающийся особенностей развития и размножения растений семейства Orchidaceae Juss, их практического использования, ассоциативных бактерий и грибов, колонизирующих ризоплану, ризосферу и воздушные корни орхидей и свойств PGPB, фитогормонов и гормоноподобных соединений, образуемые микроорганизмами. Литературный обзор написан на хорошем методическом уровне: материал систематизирован, структурирован и содержит собственные рассуждения и выводы автора по представленной тематике на основе анализ большого количества публикаций.

В главе 2 представлена исчерпывающая информация по объектам и материалам исследования, а также всех используемых автором в диссертационной работе методик, включающих современные микробиологические, микологические, цитологические и молекулярные методы, а также обширный блок биохимических и химических исследований.

Глава 3 разбита диссертантом на ряд подглав (3.1 – 3.5) согласно поставленным ранее задачам и прекрасно иллюстрирована - во всех

подглавах в качестве подтверждения имеется подробный фотоматериал, представленный в виде снимков СЭМ объектов исследования, микроморфологии изучаемых ассоциативных грибов и бактерий, а также графиков и таблиц с результатами, полученными соискателем.

Подглава 3.1. описывает результаты исследования видового состава и локализацию ассоциативных микроорганизмов в ризоплане и филлоплане эпифитных орхидных. На основании анализа полученных масштабных данных Цавкеловой Е.А. делается вывод, что особенности биологии растения-хозяина и условия его произрастания (культивирования) являются определяющими для характера колонизации корней эпифитных орхидей ассоциативными цианобактериями. Однако даже при идентичных условиях воздействия абиотических факторов автор делает выводы о существенных достоверных отличиях между фенотипическими характеристиками ассоциативных микробных сообществ (прежде всего, фототрофных микроорганизмов), что указывает на необходимость для растения, особенно безлистных видов, партнёрских взаимоотношений с ассоциативными, в том числе diaзотрофными цианобактериями. **Подглава 3.2.** является одной из ключевых результатов этой работы и посвящена идентификации ассоциативных микроорганизмов эпифитных орхидей. Диссертантом выявлено доминирующее присутствие нитчатых diaзотрофных видов, принадлежащих, преимущественно, к родам *Nostoc* и *Anabaena*, а также *Calothrix* и *Scytonema*. Воздушные корни облиственных орхидей заселяет преимущественно *Nostoc*. На субстратных корнях горшечных облиственных растений присутствуют также безгетероцистные виды *Oscillatoria*, LPP, тогда как цианобактериальное сообщество облиственных орхидей *Ph. amabilis* и *D. biggibum*, формирующих только воздушные корни, и находящихся в оптимальных по влажности и температуре для роста цианобактерий условиях, содержит наряду с доминирующими представителями *Nostoc*, *Scytonema*, *Calothrix* и другие цианобактерии (*Spirulina*, *Oscillatoria*, а также одноклеточные

виды). Отдельный блок содержит результаты по разнообразию микромицетов на корнях орхидных растений. Автором подтверждены ранее известные в литературе данные, что ассоциативные грибы являются необходимыми для устойчивого развития орхидей. Стратегия взаимодействия орхидей и их партнёров – прежде всего видов рода *Fusarium* и *Trichoderma*, как и других представителей ассоциативных грибов, показывает зависимость консорциума от окружающих биотических и абиотических факторов, а также от иммунного статуса растения. Присутствие и активное заселение ризопланы корней орхидей представителями родов *Trichoderma* и *Clonostachys* может играть значительную и решающую роль во "внешнем иммунитете" растений, защищая его от фитопатогенных видов грибов, что подчеркивает важность состава популяций ассоциативных грибов для орхидей.

Диссертантом было показано, что особенности биологии растения-хозяина и условия его произрастания (культивирования) являются определяющими для интенсивности колонизации цианобактериями корней эпифитных орхидей. Большое распространение на листовых пластинках имеют гетеротрофные бактерии и дрожжи, заселяющие и верхнюю, и нижнюю поверхности листа. Ризоплана и филлоплана эпифитных орхидей представляют собой особенную и уникальную эконишу для заселения микроорганизмами и формирования микробных сообществ. Как облиственным, так и безлистным эпифитам, в условиях произрастания, когда нет типичных субстратных корней, необходимо формирование тесных ассоциативных отношений с широким кругом различных diaзотрофных ЦБ, которые частично заменяют субстрат, создавая массивные обрастания и биоплёнки на ВК этих растений. При детальном исследовании ассоциативных бактерий воздушных и субстратных корней *D. moschatum* и *A. praemorsa* установлено, что в отличие от остальных растений, произрастающих в почве (субстрате), у эпифитных орхидей зоной максимальной микробной активности становится не ризосфера, а

именно ризоплана их субстратных и, в особенности, их воздушных корней. Исследованные ризобактерии активно заселяют поверхность семенной кожуры, колонизируя углубления на ребристой поверхности семян, образуя субпопуляции на ризоидах. Внеклеточный экзополисахаридный матрикс (ЭМ) в данном случае играет важную роль для адгезии клеток и способствует образованию бактериальных агломератов.

Подглава 3.3. в качестве основополагающих включает результаты экспериментальных исследований по микробному биосинтезу стимуляторов роста растений. Получен большой массив данных по биосинтезу фитогормонов ассоциативными микромицетами. Установлено, что основным стимулятором роста растений, который наиболее широко образуют ассоциативные микромицеты орхидей, проявляющим непосредственную биологическую активность, являются ауксины (ИУК), причём у всех изученных изолятов микроорганизмов образование ИУК оказалось триптофан-зависимым.

Впечатляющие результаты получены при изучении биосинтеза ауксинов трансгенными и диким штаммами *Fusarium*. Способность к биосинтезу фитогормонов изучена на молекулярном уровне; впервые обнаружены особенности в механизмах образования и регуляции биосинтеза ауксинов. Впервые автором изучена возможность реставрации способности к биосинтезу ГК у *Fusarium oxysporum*, который не относится к комплексу видов *Gibberella fujikuroi*, которые исходно не способны к биосинтезу гиббереллинов ввиду отсутствия одного или нескольких генов в кластере. После трансформации всего кластера генов *F. oxysporum* #1, он полностью возобновил способность к образованию ГК в больших количествах.

Среди биотехнологических аспектов работы – изучение возможности биоразложения биомассы цианобактерий и целлюлозолитических свойств микромицетов при биоконверсии субстратов термофильными метаногенными сообществами в биогаз.

Автором в диссертационной работе представлено «**Заключение**», в котором обстоятельно систематизированы результаты диссертационной работы. **Выводы** сформулированы четко и обосновано, и полностью отражают представленный экспериментальный материал.

Основные результаты работы опубликованы в 31 статье в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М. В. Ломоносова, в том числе из списка международных баз цитирования, таких как Web of Science и Scopus: 4 из них – в журналах из второго квартиля и 8 – в журналах первого квартиля. Разработанные автором методики и полученные в работе данные представлены в двух учебно-методических пособиях и патенте РФ. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Принципиальных замечаний к диссертации не имеется, однако необходимо отметить ряд вопросов, возникших по ходу прочтения текста диссертации:

1. во «**Введении, Стр. 12**» диссертант пишет: «Оптимизация условий бактериализации, в том числе с экзогенным триптофаном, для увеличения микробного биосинтеза ауксинов и сопряженная с этим селекция RGPB продуцентов ИУК продемонстрировали значительное увеличение всхожести и ускорение роста семян различных видов орхидей в условиях *in vitro*». Автор использует термин «Оптимизация», но в работе отсутствует какой-либо используемый метод оптимизации.
2. **Стр. 13: неудачно использован термин «...о биоразнообразии цианобактериальных партнёров растений»**
3. **Методы исследований. Стр. 144:** с какой целью использовали культуры из коллекций «...Дополнительно в работе были использованы микромицеты из коллекции лаборатории проф. В. Tudzynski (Westfälische WilhelmsUniversität, Münster, Germany): дикий тип штамма *FusFusarium fujikuroi* MPC IMI58289 (Commonwealth Mycological Institute, Kew, United Kingdom) и штамм m567 (Fungal Culture Collection, Weimar, Germany), а

также штаммы *F. proliferatum* D-02945 и D-00502 (Malonek et al., 2005a,b), исходно предоставленные J. F. Leslie (Kansas State University, USA), фитопатогенные для растений кукурузы *F. verticillioides* 149 (Oren et al., 2003), патоген растений томата *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 42-87 (Di Pietro and Roncero, 1998) из коллекции микромицетов лаборатории проф. A. Sharon (Department of Molecular Biology and Ecology of Plants, Tel Aviv University, Tel Aviv)

4. **Стр. 154:** в разделе Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) и флуоресцентная микроскопия указано, что: «Измерение относительной флуоресценции YFP и dsRED проводили на 50 спорах...». Автор указывает, как детектировали наличие флуоресцентных белков, которые кодируют гены, отвечающие за их биосинтез, в составе плазмиды которые вводили при трансформации штамма-реципиента *Fusarium proliferatum* ET1. Однако в методе не указано, как получали споры рекомбинантного штамма, и почему не оценивали наличие плазмид в мицелии?

5. **Стр. 163:** Автор указывает: «...Для трансформации микромицетов рода *Fusarium* проводили приготовление протопластов и трансформацию, следуя ранее описанной методике (Tudzynski and Tudzynski, 1996). Аликвоту (50 мкл) 107 протопластов трансформировали, используя 10 мкг кольцевого комплементационного вектора pCos1 (Bömke et al., 2008b), несущего полный кластер ГК генов...». Хотелось бы пояснить, каким методом получали протопласты штамма-реципиента?

6. **Стр. 174.** На этой стр. приводится Определение влияния микромицетов рода *Fusarium* на развитие *Dendrobium moschatum* и *Dendrobium nobile*. Автор, к сожалению, не приводит цель этого эксперимента, и не исследует фитопатогенные свойства выделенных штаммов в собственных исследованиях.

7. **Стр. 174-175:** Приводятся методы оценки антимикробной активности экстрактов орхидных растений в отношении ряда штаммов

“В качестве тест-культур использовали грамположительную споровую культуру *Bacillus cereus*, грамположительную **бесспоровую** культуру *Staphylococcus aureus* и грамотрицательную культуру *Escherichia coli* из коллекции кафедры микробиологии МГУ”. Нет обоснования использования именно этих штаммов, шифры которых не указаны. А раньше не проводились исследования антимикробной активности спиртовых экстрактов орхидных в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий? По какому принципу отбирали тест культуры бактерий филлосферы орхидных?

8. Глава “Результаты и их обсуждение”

Раздел **Локализация ассоциативных микроорганизмов в ризоплане и филлоплане эпифитных орхидных**. В этой части диссертационной работы убедительно показано, большое разнообразие микроорганизмов, заселяющих корневую поверхность, ризоплану и филлоплану. Автор доказывает, что нитчатые формы цианобактерий формируют подобие каркаса, который и определяет состав микробного сообщества ризопланы воздушных корней. В доказательство этому утверждению, автор прекрасно иллюстрирует с использованием СЭМ микроморфологию ассоциаций симбиотрофного сообщества фототрофных и гетеротрофных бактерий и мицелия грибов. Однако хотелось бы уточнить, как, используя фактический материал, представленный на рис. 35-38, автор оценивает присутствие клеток гетеротрофных бактерий?

9. **Стр.230** Анализируя результаты раздела 3.2.3.1. Биоразложение мортмассы цианобактерий с образованием биогаза (стр. 227-230), автор показывает возможность утилизации этой биомассы различными микробными консорциями термофильных и мезофильных метаногенов. Анализируя полученные результаты, автор диссертационной работы, с одной стороны, подчеркивает, что фототрофные микроорганизмы можно использовать как альтернативный источник биотоплива, а с другой стороны, источником парниковых газов (CO_2 , CH_4 и N_2O), а также

ресурсом для роста и развития, а также для формирования симбиотических отношений микоризообразующих грибов с растением-хозяином (стр. 230). В результате такого заключения неясно, какую перспективу имеет мортмасса цианобактерий для получения биотоплива? Автор не приводит для этого никаких схем процесса биотехнологии биогаза. Или это просто проблема утилизации отмирающей биомассы орхидных с симбиотрофами, в том числе с цианобактериями? Но насколько это актуально в аспекте масштабности в биосфере?

10. В разделе 3.2.3.3. Предобработка целлюлозосодержащих субстратов для получения биогаза (стр. 234-236) приводятся результаты предварительного гидролиза целлюлозосодержащей массы выделенным микромицетом *Trichoderma viride* и показано увеличение выхода биогаза. Однако автор не приводит титр инокулята, вносимого в субстрат, условия биодegradации. Неясно также, чем выделенный штамм лучше уже хорошо известных продуцентов целлюлаз, и какова дальнейшая перспектива использования штамма? Возможна ли разработка технологического регламента на основе этого штамма и депонирование в сервисной коллекции культур?

11. К основному биотехнологическому аспекту работы относится разработка технологии бактеризации семян орхидей с помощью селективированных аборигенных и нерезидентных культур PGPB, что позволяет значительно увеличить всхожесть и ускорить развитие растений при их семенном размножении. Что же именно “биотехнологического” автор понимает под бактеризацией семян? Обработка, или особенности обработки?

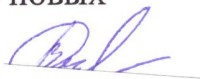
Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к докторским диссертациям. Содержание диссертации соответствует паспортам специальностей 03.02.03 – «микробиология» и

03.01.06 – «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертация оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Е.А. Цавкелова заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.03 – «микробиология» и 03.01.06 – «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент, заместитель
директора по научной работе ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт по изысканию новых
антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»



Садыкова В. С.

30.04.2021

Специальность, по которой официал. нентом защищена
диссертация: 03.02.12 – Микология; 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Контактные данные: тел. +7(499) 255-20 -13 e-mail: sadykova_09@mail.ru

Адрес организации: 119021, Москва,

ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых
антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Отзыв Садыковой В.С. заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИНА», 

О.В. Кисиль

