

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Агафоновой Надежды Валерьевны «Таксономическая и функциональная характеристика аэробных метилотрофных бактерий-фитосимбионтов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - микробиология

Аэробные метилотрофные бактерии широко распространены в природе и часто ассоциированы с растениями (обнаружены в семенах, филлосфере и ризосфере растений). Относительно недавно установлено, что метанол и другие С₁-соединения являются продуктами метаболизма растений, что и объясняет симбиоз метилобактерий с растениями. Метилотрофные бактерии используют С₁-метаболиты растений в качестве источника углерода и энергии. Показано, что метилотрофы могут положительно влиять на рост и развитие растений за счет секреции биологически активных веществ (фитогормонов, витаминов). Кроме того, некоторые метилотрофные бактерии могут защищать растения от фитопатогенов, фиксировать атмосферный азот; а также уменьшать содержание в растениях стрессового гормона этилена. Актуальность диссертационной работы Н.В. Агафоновой состоит в выделении новых штаммов аэробных метилобактерий-фитосимбионтов, а также во всестороннем исследовании механизмов положительного влияния метилотрофов на рост и развитие растений.

Диссертационная работа написана и оформлена согласно требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям: она изложена на 156 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, раздела, включающего описание материалов и методов исследования, экспериментальной части, заключения, выводов и списка сокращений. Список цитируемой литературы включает 332 наименования. Диссертация хорошо иллюстрирована, содержит 12 таблиц и 42 рисунка.

Во введении Н.В. Агафонова обосновала актуальность, научную новизну и практическую значимость данного исследования, четко сформулировала цели и задачи. Обзор литературы имеет непосредственное отношение к теме диссертации, он посвящен современному состоянию исследований в области изучения аэробных

метилотрофных бактерий. Обзор литературы состоит из нескольких разделов. В начале обзора рассмотрены особенности биологии аэробных метилотрофов, в частности, пути окисления и ассимиляции C₁-соединений. Описаны методы идентификации аэробных метилотрофных бактерий. Далее автором подробно анализируются ассоциации данных микроорганизмов с растениями, а также механизмы фитосимбиоза. В обзоре подчеркивается, что необходимо изучение биоразнообразия аэробных метилотрофных фитосимбионтов, а также их способности к синтезу фитогормонов и других биологически активных соединений. Это позволит провести отбор наиболее перспективных стимуляторов роста и развития растений для использования в новых биотехнологиях культивирования растений. Обзор литературы убеждает в глубоком понимании Н.В. Агафоновой как предыстории проблемы, так и современного ее состояния и подтверждает правомерность постановки задач и определения путей их решения. В целом обзор литературы является теоретическим обоснованием для выбора стратегии собственных исследований автора работы.

Материалы и методы изложены четко и подробно описаны. Автором использован широкий спектр современных методов микробиологии, биотехнологии и биохимии. Эти методы применены для идентификации и анализа перспективных штаммов аэробных метилобактерий-фитосимбионтов. Выделенные штаммы бактерий охарактеризованы с помощью микроскопии, спектрофотометрических, хроматографических, молекуллярно-генетических и биохимических методов. Кроме того, автором использованы различные методики культивирования растений и проведен биохимический анализ колонизированных растений. Применение разных подходов, несомненно, делает результаты работы надежными и достоверными. Статистический анализ проведен корректно. Основные научные положения диссертации и выводы обоснованы и логично вытекают из полученных экспериментальных данных.

Экспериментальная часть диссертации Н.В. Агафоновой состоит из нескольких частей. Вначале автором были выделены 38 чистых культур метилобактерий из филлосферы и ризосферы различных растений, проведена первоначальная филогенетическая характеристика полученных штаммов на

основании анализа 16S рРНК. Показано, что большинство полученных штаммов являются розовоокрашенными представителями рода *Methylobacterium*. Автором описана морфология новых изолятов аэробных метилотрофных бактерий, а также исследованы их культуральные, физиолого-биохимические и хемотаксономические свойства. Проанализировано использование различных источников углерода исследуемыми штаммами и проведен анализ ферментативной активности. С использованием подходов полифазной таксономии Н.В. Агафоновой описаны три новых вида: *Methylopila turkensis*, *Ancylobacter sonchi* и '*Methylobacillus caricis*'. Впервые описан метилотрофный представитель рода *Delftia*, способный расти на метаноле – естественном продукте метаболизма растений – штамм *Delftia* sp. Lp-1. Показано, что описанные штаммы реализуют различные пути C₁-метаболизма (сериновый, рибулозобисфосфатный, рибулозомонофосфатный).

В дальнейших исследованиях Н.В. Агафоновой проанализирован синтез фитогормонов (ауксинов и гиббереллинов) выделенными культурами метилотрофов. Все исследуемые штаммы синтезировали ауксины в различных концентрациях. Автором впервые доказана способность облигатного метилотрофа *Methylobacillus arboreus* IvaT синтезировать биоактивную гибберелловую кислоту GA3. Недавно появились работы об участии гиббереллинов в защите растений от стресса. Н.В. Агафоновой обнаружено, что колонизация гороха штаммом *Mb. arboreus* IvaT существенно повысила устойчивость растений к окислительному стрессу, вызванному паракватом.

Одной из важных характеристик исследуемых штаммов метилобактерий-фитосимбионтов является их способность к солюбилизации нерастворимых фосфатов, необходимых для роста растений. Н.В. Агафоновой впервые показана фосфатсолюбилизирующая активность у 14 штаммов аэробных метилобактерий, ассоциированных с растениями, и принадлежащих к родам *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylovorus*, *Methylopila*, *Methylobacterium*, *Delftia* и *Ancylobacter*.

Известно, что многие микроорганизмы способны синтезировать низкомолекулярные метаболиты, специфически связывающие ионы железа и некоторых других металлов. Автором выявлена способность к хелатированию

ионов железа при помощи сидерофоров у 11 из исследуемых культур. Показано, что некоторые штаммы синтезировали сидерофоры катехолового типа.

Н.В. Агафоновой была проверена антагонистическая активность нескольких штаммов метилобактерий по отношению к фитопатогенным грибам и бактериям. Такая активность показана только для *Delftia* sp. Lp-1 против грибов *Rhizoctonia solani* и *Fusarium sporotrichum*, а также бактерий рода *Bacillus*. Автор предполагает, что возможно, это связано с синтезом сидерофоров. Несмотря на то, что многие из исследованных штаммов синтезировали сидерофоры, результаты получены только для одного вида метилобактерий. Возможно, в дальнейшем необходимы эксперименты по анализу устойчивости колонизированных растений к фитопатогенам.

В следующих главах диссертации описываются эксперименты по анализу устойчивости растений гороха, колонизированных аэробными метилотрофами, к окислительному стрессу, вызванному гербицидом паракватом. Исследован ряд параметров, указывающих на чувствительность растений к параквируту – активность антиоксидантных ферментов, повышение концентрации H_2O_2 , уровень перекисного окисления липидов, повышение содержания пролина. Проанализированы некоторые фотосинтетические характеристики растений. Результаты экспериментов отличались для разных штаммов метилобактерий, однако в целом колонизация растений снизила негативный эффект окислительного стресса, вызванного паракватором.

В дальнейших экспериментах Н.В. Агафоновой продемонстрировано влияние метилобактерий на рост и морфогенез растений как *in vitro*, так и в микровегетационных условиях. Колонизация семян фасоли, гороха, огурца и томата аэробными метилотрофными бактериями стимулировала рост и развитие побегов, формирование корневой системы, положительно влияла на работу фотосинтетического аппарата растений. Таким образом, автором показана перспективность использования исследованных штаммов метилобактерий в качестве стимуляторов роста важных сельскохозяйственных культур.

Новизна и актуальность данного диссертационного исследования не вызывают сомнения, поскольку Н.В. Агафоновой идентифицированы и

всесторонне охарактеризованы новые штаммы аэробных метилотрофных бактерий-фитосимбионтов, которые в дальнейшем могут быть использованы в практических целях. Следует отметить, что диссертация хорошо оформлена, имеет большое количество иллюстративного материала, написана четким, понятным языком. Замечаний по диссертации практически нет. Есть небольшое количество опечаток, погрешности в стиле изложения, некоторые сокращения отсутствуют в «Списке сокращений» (например, PQQ, п.н.). На рис. 25, 28 сбоку от электрофорограмм неплохо бы указать молекулярную массу (п.н.) некоторых полос маркера молекулярной массы ДНК. Однако эти замечания носят рекомендательный характер и не умаляют значения полученных результатов.

При прочтении работы возникли вопросы, ответы на которые хотелось бы услышать от автора.

1. Известно, что колонизация метиlobактериями повышает урожайность различных культур растений. Имеются ли в мире масштабные испытания данного метода и внедрение его в практику?
2. Планируете ли Вы анализ устойчивости колонизированных метилотрофами растений к фитопатогенным грибам и бактериям?
3. В описанных экспериментах не все метиlobактерии проявляли антагонистическую активность против фитопатогенов, несмотря на наличие сидерофоров. Нельзя ли улучшить штаммы метиlobактерий путем введения в них генов антибиотиков или antimикробных пептидов? Имеются ли такие исследования?
4. В главе «Материалы и методы» написано, что культивирование растений *in vitro* и в нестерильных условиях проводили при 23-25⁰С и 16-часовом световом периоде. Какова была величина освещенности, которая является важным параметром при выращивании растений?

В целом, диссертационная работа Н.В. Агафоновой отличается новизной и научной значимостью полученных данных. Выводы подтверждены большим количеством экспериментов и их достоверность не вызывает сомнений. Материалы диссертации опубликованы в престижных российских и зарубежных журналах из

списка ВАК РФ и доложены на нескольких международных и отечественных конференциях. Автореферат полностью и адекватно отражает содержание диссертации.

Таким образом, диссертационная работа Агафоновой Надежды Валериевны на тему «Таксономическая и функциональная характеристика аэробных метилотрофных бактерий-фитосимбионтов» является законченной научно-квалификационной работой, имеющей большое научное и практическое значение для современной микробиологии и биотехнологии. По актуальности темы, новизне, теоретической и практической значимости результатов работа соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями Постановления Правительства РФ от № 335 от 21.04.2016 г. «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Агафонова Надежда Валериевна, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.02.03 - микробиология.

Старший научный сотрудник
лаборатории биотехнологии растений
Филиала Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

142290 г. Пущино Московской обл.,

Проспект Науки, д. 6

доктор биологических наук

(03.01.03 – молекулярная биология)

E-mail: ruk@bibch.ru

Тел. 8-4967-33-09-70

13 ноября 2017 г.



Рукавцова Елена Борисовна

Подпись заверяю
начальник отдела кадров

 С.И.Биляр