

ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук Киселевой
Марины Ивановны на диссертационную работу

Шагаева Антона Александровича

«Разработка методов оценки характеристик и свойств грибов *Fusarium oxysporum* и *Trichoderma viride* при метаболизме экссудатов корневой системы огурца гибрида F₁ Атлет»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы диссертации. Диссертационная работа А.А. Шагаева посвящена актуальной теме: разработке методов биотехнологического контроля процессов, происходящих на уровне ризосферы корневой системы огурца гибрида F₁ Атлет. Ризосфера – это биологическая система, состоящая из слоя почвы, прилегающей к корню растения, и служащая пищевой нишей для сложных микробных сообществ. Состав и концентрация микроорганизмов в ризосфере зависит от многих условий биотического и абиотического характера, но основным фактором, влияющим на их развитие и конкуренцию за пищевой субстрат, является секреция корнями органических веществ – экссудатов. Кроме этого, в ризосфере существует большое количество симбиотических микроорганизмов, стимулирующих рост растений и защищающих растения от фитопатогенных видов грибов и бактерий. Актуальность темы бесспорна и обусловлена тем, что решение поставленных задач связано с разработкой методов, отвечающих за возможности регуляции процессов, протекающих в ризосфере, и минимизации вредного влияния фитопатогенных микроорганизмов на растение-хозяина. Вышеперечисленное обуславливает научную значимость диссертационной работы, а, следовательно, актуальность работы А.А. Шагаева не вызывает сомнений.

Целью диссертационной работы А.А. Шагаева является разработка методов оценки характеристик и свойств грибов при метаболизме экссудатов, а также изучение особенностей взаимодействия грибов с растениями огурца.

Для достижения поставленной цели были обозначены следующие задачи:

- определить качественный и количественный состав органических компонентов, входящих в состав экссудатов, и оценить их влияние на развитие растений при обработке разными концентрациями модельного раствора прикорневой зоны огурца;

- исследовать особенности развития грибов *F. oxysporum* и *T. viride* в условиях естественной экссудации огурца и искусственно подобранной среды, моделирующей состав экссудатов, при поверхностном и глубинном культивировании;

- изучить морфологические особенности и свойства грибов при развитии *F. oxysporum* и *T. viride* на поверхности мембранного биореактора при постоянном подводе искусственной среды, моделирующей экссудаты огурца;

- оценить влияние экссудатов огурца (модели экссудатов) на фитопатогенные свойства *F. oxysporum* при развитии в прикорневой зоне растений на фоне других микроорганизмов.

Все сформулированные цели и задачи успешно выполнены соискателем в ходе проведенных многопрофильных научных исследований.

Диссертационные исследования имеют практическое значение для биологической защиты огурца в условиях тепличных комбинатов.

Научная новизна исследования. На основании оценки А.А. Шагаевым состояния биологических аспектов защиты от болезней и получения продукции в тепличных комбинатах, а также анализа многочисленных источников отечественной и зарубежной литературы, были разработаны методологические направления исследований для проведения научной работы. В результате значительного объема проведенных исследований установлен состав органических компонентов экссудатов корневой системы огурца гибрида F₁ Атлет. Соискателем впервые показано, что основными компонентами экссудатов корней огурца являются органические кислоты: янтарная, яблочная, лимонная.

Разработанный метод использования искусственной питательной среды, моделирующей состав экссудатов, позволил изучить развитие и взаимодействие симбиотических и фитопатогенных микроорганизмов друг с другом и с растением. На основании данных о составе органических кислот, выделяемых корнями огурца при выращивании в стерильных условиях, была подобрана рецептура раствора – модели экссудатов, – в состав которого входят органические кислоты и моносахара. Новые экспериментальные данные по влиянию экссудации корней на взаимодействие микроорганизмов показали, что дополнительное внесение экссудатов оказывает влияние на синтез ряда гидролитических ферментов. Соискатель доказал эффективность внесения искусственной среды, моделирующей состав экссудатов, в поливной раствор для снижения уровня фитопатогенности *F. oxysporum*, а также для повышения уровня антагонистической активности *T. viride*. Полученные результаты расширяют представление о процессах, происходящих в структуре ризосферы огурца, и могут служить для

предупреждения и профилактики микробиологического поражения растения огурца болезнями. Диссертационная работа является актуальной, а полученные результаты обладают научной новизной и практической значимостью. По своей направленности, тематике и методологии исследований работа полностью соответствует специальности 1.5.6. Биотехнология.

Теоретическая и научно-практическая ценность полученных результатов. Представленная работа является фундаментальным и прикладным исследованием, которое может быть рекомендовано для оптимизации мероприятий по биологической защите растений, так как в ней демонстрируются новые подходы к методам изучения метаболизма различных видов грибов в процессе метаболизма ими экссудатов растений. Полученные результаты являются теоретической основой для обоснования физиологических особенностей метаболизма грибов при развитии на экссудатах огурца, а также показывают возможные пути повышения устойчивости растений к различным биотическим стрессам, возникающим в процессе их развития.

Исследования позволили определить влияние экссудатов корневой системы на подавление ферментов литического ряда, синтезируемых грибами *F. oxysporum* и *T. viride*. Полученные знания в этой области позволят сформировать системный подход при проведении мероприятий по биологической защите растений от болезней.

Результаты исследования использованы при создании органического удобрения «ВитАмин» № государственной регистрации 008(101)-20-3373-1. Данный препарат прошел испытания и используется в схемах биологической защиты растений.

Степень обоснованности и достоверность полученных результатов исследования. Достоверность полученных результатов подтверждается большим объемом и достаточным количеством повторений в вариантах проводимых экспериментов. Полученные результаты оформлены должным образом, убедительны и подкреплены статистической обработкой; проанализированы с учетом многочисленных данных отечественной и зарубежной научной литературы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Определение основных компонентов, составляющих экссудаты корневой системы огурца гибрида F₁ Атлет, и влияние концентрации экссудатов в прикорневой зоне огурца на скорость накопления абсолютно сухой массы растения.

2. Влияние экссудатов в прикорневой зоне огурца на активность целлюлолитических и протеолитических ферментов у штаммов грибов *T. viride* F2001 и *F. oxysporum* F2106.

3. Разработка метода оценки взаимодействия грибов при непрерывном подводе компонентов питания при культивировании на мембранном реакторе.

4. Изучение типов взаимодействия чистых культур фитопатогенного штамма *F. oxysporum* F2106 и перспективного агента биологического контроля штамма *T. viride* F2001 на искусственных средах, приближенных к реальным условиям по составу и количеству органических веществ в прикорневой зоне огурца.

5. Влияние искусственной модели экссудата на снижение паразитической активности гриба *F. oxysporum* за счет репрессии литических ферментов.

Положения, выносимые на защиту диссертации, определялись результатами, полученными соискателем в процессе многочисленных разноплановых исследований; они соответствуют целям и задачам проведенной работы. Обсуждение полученных результатов осуществлялось с привлечением большого количества оригинальных источников.

Публикация и апробация результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК и входящих в реферативную базу РИНЦ, международные реферативные базы по научным публикациям WoS и Scopus. Полученные результаты доложены в разные годы на пяти Международных и Всероссийских форумах.

Структура и содержание диссертационной работы. Материалы диссертационной работы изложены на 139 страницах машинописного текста. Работа содержит 37 рисунков и 4 таблицы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, полученных результатов, их обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Библиография включает 207 отечественных и зарубежных источников.

Во введении обоснованы актуальность исследований, степень разработанности темы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов, структура диссертации. Приводятся оценка личного вклада автора в выполнение работы, публикации по материалам диссертации и апробация

работы, а также – благодарности соискателя оказывавшим помощь при её выполнении.

В главе I «Обзор литературы» соискатель А.А. Шагаев рассматривает широкий круг вопросов, касающихся влияния корневой экссудации на биологическое разнообразие микроорганизмов в ризосфере, воздействия стрессовых факторов абиотической и биотической природы на микроорганизмы и растения, роли сахаров в обеспечении механизмов защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов, а также использования агентов биологического контроля для борьбы с болезнями растений.

Соискатель, пользуясь источниками литературы зарубежных и отечественных авторов, дает подробное описание системы взаимодействия различных микроорганизмов, сосуществующих в ризосфере корней, на примере разных видов растений. Им приводятся данные, что одним из механизмов адаптации растений к почвенным условиям и присутствию микроорганизмов является выделение корневых экссудатов – органических веществ сложной химической природы. Анализируются данные по воздействию секреции растений на микроорганизмы, существующие за счет метаболизма экссудатов. При этом содержание экссудатов и количество выделяемых веществ зависят от множества факторов, включающих в том числе вид растения, тип корневой системы, наличие в ризосфере фитопатогенной микрофлоры, токсичных веществ и стрессовых факторов среды. Приводится анализ содержимого экссудатов, которое может включать йоны, соединения на основе углерода, аминокислот, стероидов и многих других химических соединений. При достаточных концентрациях экссудаты корней способны оказывать влияние (как положительное, так и отрицательное) на соседние растения, а также на состав и концентрацию микроорганизмов в ризосфере.

В источниках литературы, используемых соискателем, показано, что углеводы (сахара) в составе экссудатов играют значительную роль в проявлении стрессоустойчивости растений к различным абиотическим и биотическим факторам окружающей среды. Приводится анализ влияния экссудации корней на патогенез грибов, что дает возможность использовать некоторые виды микроорганизмов в качестве агентов биологического контроля для выращивания здоровых растений.

Соискатель легко работает с авторскими и обзорными источниками литературы: адекватно сопоставляет их данные между собой и со своими результатами, что свидетельствует о его высоком квалификационном уровне.

В главе II «Методическая часть» дана адекватная оценка объектов, материалов и методов, применяемых для такого рода исследований.

Заслуживают внимания исследования, проведенные экспериментальными методами выращивания огурца в стерильных условиях с последующим определением состава и концентрации синтезируемых экссудатов. Соискателем подробно изучены методы, используемые при изучении чистых культур микроорганизмов, например, методы поверхностного и глубинного культивирования *T. viride* и *F. oxysporum*, метод встречных колоний и т.п.

Широкий спектр разноплановых методов, использованных при проведении исследования, позволяет сделать вывод, что работа выполнена на высоком методологическом уровне, а соискатель является высококвалифицированным специалистом.

В главе III соискатель приводит результаты, касающиеся изучения свойств и особенностей секреции экссудатов растениями огурца, сравнения искусственного раствора и естественного раствора экссудатов, развития микроорганизмов на них и метаболизм пищевой субстанции, моделирования взаимоотношений грибов и растений. Основными показателями, по которым оценивались взаимодействия грибов и растений, являлись химическое потребление кислорода и коэффициент экссудации. Эти данные получены в динамике при расчетах доли секретируемых органических веществ к показателю абсолютно сухого веса растений. Показано, что увеличение массы растений приводит к повышению концентрации органических веществ в прикорневой зоне огурца. Указывается также, что концентрация экссудатов пропорциональна накоплению зеленой массы растений, при этом повышенная концентрация экссудатов в прикорневой зоне при отсутствии микроорганизмов негативно влияет на ростовые характеристики растений.

Отмечено, что при определении химических компонентов экссудатов огурца основную часть составляли органические кислоты – янтарная, яблочная и лимонная, и сахара – фруктоза и глюкоза. Эти органические кислоты и сахара составляли 45-60% от общего количества компонентов экссудатов растений огурца.

Соискателем указывается, что в ризосфере корней огурца формируется биоценоз, состоящий из большого количества патогенных и непатогенных микроорганизмов. Для изучения типов взаимоотношений микроорганизмов соискатель использовал метод культивирования микромицетов на искусственно созданной среде, моделирующей экссудаты огурца, близкой по составу и свойствам к природной. При сравнении грибов на стандартных средах и средах, моделирующих экссудаты растения с различными концентрациями искусственных экссудатов, были выявлены определенные

закономерности не только по морфолого-культуральным признакам, но и проявлению антагонистических свойств, фитотоксичности и т.п.

Соискателем получены данные по моделированию развития микроорганизмов в ризосфере живого растения. Для этого была разработана и создана специальная установка для культивирования микроорганизмов с непрерывной подачей искусственного раствора, имитирующего секрецию экссудатов растением. Задачей данного исследования было изучение особенностей развития колоний штаммов *T. viride* и *F. oxysporum*, оценка велась по количеству остаточных органических веществ и показателю протеолитической и целлюлолитической активности. Результаты экспериментов показали, что при совместном культивировании выбранных штаммов на поверхности с непрерывным подводом питательной среды *T. viride* полностью подавляет рост *F. oxysporum*.

Интересным является вывод, что проникновение *F. oxysporum* в ткани растения происходит только при недостаточной экссудации. Соискатель объясняет это явление сложным механизмом катаболитной репрессии, при котором в случае дефицита экссудации грибок становится агрессивным по отношению к растению.

Результаты изложены подробно и описывают:

- методику изучения процесса экссудации корневой системы огурца (гибрид F₁ Атлет) и процесс подготовки раствора, имитирующего основные компоненты экссудатов огурца;

- эффективность метаболизма модельного раствора экссудатов грибами *F. oxysporum* F2106 и *T. viride* F2001 при поверхностном и глубинном культивировании, и условия для проявления их антагонистической активности;

- методы культивирования грибов с использованием мембранного реактора, имитирующего условия развития штаммов *F. oxysporum* F2106 и *T. viride* F2001 на искусственном растворе экссудатов.

Актуальность, новизна исследований, высокий методический уровень, большой объем проделанных экспериментов и квалифицированное обсуждение результатов с привлечением большого количества оригинальных источников позволяют положительно оценить данную научную работу.

В качестве вопросов и замечаний к содержанию диссертации можно отметить следующее:

1. Не сформулированы основные положения возможности использования полученных экспериментальных данных для разработки методов биологической борьбы с патогенной грибной микрофлорой растений.

2. Соискателю следовало бы в заключении указать направление дальнейших исследований, поскольку проблемы метаболизма экссудатов представлены на примере только двух видов микроорганизмов, и проблемы с фитопатогенными комплексами на культуре огурца наверняка остались. Каков предполагаемый экономический эффект использования разработанных Вами методов для выращивания овощной продукции в условиях закрытого грунта? Какие пути Вы предлагаете для продолжения исследований в решении вопросов, касающихся биоценозов ризосферы?

3. Стр. 53 «Физиолого-биохимические признаки: Штамм *F. oxysporum* является строгим аэробом, сапротрофом». Скорее всего, этот вид грибов относится к гемибиотрофам, поскольку в определенных условиях он хорошо развивается в межклеточном пространстве живых тканей растений.

4. Глава «Материалы и методы» написана подробно и содержательно, с выкладками шкал, расчетов и графиков. В связи с этим не понятно, почему большое количество методических описаний встречается в главах с результатами, например, стр. 68, 72, 78, 81.

К сожалению, иногда в тексте диссертации встречаются стилистические погрешности и опечатки. Тем не менее, приведенные замечания не снижают общего положительного впечатления от работы и, в основном, носят частный характер.

Соответствие диссертации критериям «Положения о присуждении ученых степеней».

Диссертационная работа Шагаева Антона Александровича на тему: «Разработка методов оценки характеристик и свойств грибов *Fusarium oxysporum* и *Trichoderma viride* при метаболизме экссудатов корневой системы огурца гибрида F₁ Атлет» является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи по разработке методов моделирования и контроля развития микроорганизмов в ризосфере живого растения, имеющей важное значение для развития агробιοтехнологии, и соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки) по направлениям исследования 13 (в части агробιοтехнологий), 17 (в части биотехнологии для повышения продуктивности сельского хозяйства), 21 (в части моделирования биологических процессов).

Основные результаты диссертации доложены в разные годы на пяти международных и всероссийских форумах, опубликованы в четырнадцати

печатных работах, в том числе 4 статьях в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и журналы из перечня ВАК РФ.

Автореферат и публикации соответствуют основному содержанию диссертации.

Диссертационная работа Шагаева Антона Александровича на тему: «Разработка методов оценки характеристик и свойств грибов *Fusarium oxysporum* и *Trichoderma viride* при метаболизме экссудатов корневой системы огурца гибрида F₁ Атлет» по своей актуальности, научной новизне, а также по научной и теоретической значимости соответствует требованиям Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» (с изменениями и дополнениями), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук (06.01.11. – защита растений), старший научный сотрудник отдела микологии и иммунитета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» (ФГБНУ ВНИИФ).

Киселева Марина Ивановна



Тел. +7-916-376-34-92

e-mail: shlem2015@mail.ru

22. апреля .2024

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии»
(ФГБНУ ВНИИФ)

143050, Московская область, Одинцовский район, р.п. Большие Вяземы, ул.
Институт, владение 5. Тел. +7 (495) 597-42-28, E-mail: vniif@vniif.ru, web-site:
<http://vniif.ru/>

Подпись Киселевой Марины Ивановны заверяю:

Марьямем
22.04.2024



Кузнецов Д. В.

М.П. _____ / _____