

## ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу Попковой Екатерины Геннадиевны на тему «Клавиципитальные эндофиты злаков Москвы и Московской области», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.12 - микология»**

Эндофитные микроорганизмы живут в разных частях растения: корнях, стеблях, листьях, цветках, плодах и семенах, колонизируя, как правило, внутри- или межклеточное пространство внутренних тканей [Posada et al., 2005; Ryan et al., 2007; Miller et al., 2012; Gangwar et al., 2014; Li et al., 2018]. Эндофиты растений смягчают последствия экологического стресса: высоких температур, недостатка питательных веществ, воды, неблагоприятных условий и т.д. Наиболее часто выделяемыми эндофитными микроорганизмами являются мицелиальные грибы, однако, несмотря на это, до настоящего времени данных в литературе о биологии системных эндофитов злаков, их функциональной роли в симбиозе с растениями крайне мало, и эта группа грибов практически не изучена, особенно на территории Российской Федерации. Актуальность изучения данной группы организмов также обусловлена их способностью продуцировать целый ряд биологически активных соединений, как стимулирующих рост растений, так и высокотоксичных для теплокровных животных и человека, которые могут оказывать негативное влияние при контаминации этими грибами кормовых и дикорастущих злаков.

**Целью работы** Попковой Е.Г. было исследование биологии эндофитных грибов, изолированных из дикорастущих злаков и их влияние на растение-хозяина. В соответствии с поставленной целью решался ряд задач:

1) выявление клавиципитальных эндофитных грибов в тканях растений, создание коллекции чистых культур и их идентификация; 2) изучение особенностей морфологии и цитологических характеристик изолятов и закономерностей распределения эндофитного мицелия в растении при росте на гидропонике и в открытом грунте; 4) исследование влияния эндофитной инфекции на ростовые характеристики растения-хозяина при росте на средах с варьированием минерального состава.

Цель отличается конкретикой, а задачи сформулированы четко и затем успешно решены экспериментально.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

Основной научной новизной работы является существенное пополнение данных о видовом разнообразии, биологии и функциональной роли в растениях клавиципитальных грибов - эндофитов злаковых растений. Эндофитная инфекция была обнаружена у 6 видов злаков из 15 изученных (*Lolium perenne*, *Festuca rubra*, *F. pratensis*, *F. arundinacea*, *F. gigantea* и *Elymus caninus*). На территории России Попковой Е.Г. впервые обнаружены зараженные популяции *Festuca gigantea* (L.) Vill., *F. arundinacea* Schreb. и *Elymus caninus* (L.) L., из которых получены и идентифицированы изоляты эндофитных грибов. Впервые также отмечены случаи заражения российских злаков эндофитами видов *Epichloë festucae*, а также *Epichloë occultans*, который является продуцентом ряда опасных для теплокровных животных алкалоидов, что представляет несомненную практическую ценность работы при учете и мониторинге наличия этих микромицетов в кормах для сельскохозяйственных животных. Автором показано преимущество работы с молодыми проростками по сравнению с семенами при ПЦР-диагностике присутствия потенциально токсичных эндофитов злаковых культур.

Особую научную ценность для микологии представляет впервые показанная возможность существования водно-воздушных гифомицетов (род *Tricladium*) в виде системных эндофитов злаков, распространяемых вертикально вместе с зараженными семенами.

Изучение цитологических особенностей эндофитов позволило диссертанту выявить новые структуры и особенности развития мицелиальных грибов как при росте в чистой культуре (формирование вторичных поровых контактов), так и при развитии в растительных тканях (образование необычного «тонкого» мицелия).

### **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 микологии, а также прикладных задач сельскохозяйственной биотехнологии и представляют практическую ценность. Предложенные автором заключение и практические предложения делают реальным их использование для разработки методологии оценки биологической безопасности кормов для сельскохозяйственных животных.

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

Важным для практического значения и развития работ в данном направлении является создание диссертантом коллекции чистых культур эндофитных грибов злаков. Установлено, что помимо важной для селекции кормовых и газонных трав ассоциации между луговой овсяницей (как дикорастущей, так и сортовой) и грибом *Epichloë uncinata*, обнаруженной и изученной ранее рядом исследователей, на нашей территории имеются другие ассоциации, в частности, между дикорастущими злаками и эндофитными грибами, известными своей способностью к синтезу алкалоидов, опасных для теплокровных животных. Показана способность эндофитных грибов колонизировать разные органы растений, развивающихся на гидропонике и в естественных местообитаниях, причем формировать мицелий различного диаметра. На примере клавиципитальных эндофитов впервые для аскомицетов показана способность формировать вторичный поровый контакт между коллатеральными гифами.

Структура работы Е.Г. Попковой написана по традиционному принципу: диссертация изложена на 166 страницах, содержит 37 рисунка и 18 таблиц. Состоит из введения, главы 1 «Обзора литературы», главы 2 «Материалы и методы», главы 3 «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Приложения». Список цитированной литературы включает 175 источников, в том числе 165 печатных работ иностранных авторов.

**В Главе 1** (Литературный обзор) дана подробная характеристика грибов - эндофитов растений, подразделению их на группы, согласно их современному систематическому положению и приуроченности к растению - хозяину. Основная часть литературного обзора (1.2 -1.6) посвящена систематике и таксономии основных объектов, изучаемых диссертантом - эндофитов злаков, описанию их жизненных циклов, распространению в различных экотопах и функциональным свойствам в растениях - хозяевах,

механизму действия биологически активных вторичных метаболитов (на примере алкалоидов), продуцируемых грибами этой группы, а также их роли в болезнях травоядных животных. Обзор представляет самостоятельную ценность, так как отражает состояние изученности данной тематики в мировой научной литературе, емко, кратко и хорошо написан, и читается с большим интересом.

**В Главе 2** (Материалы и методы) обстоятельно и подробно приведен весь перечень методик, используемых автором, имеется детальная характеристика образцов и объектов исследования. Соискателем использованы классические методы микологических исследований (сбор материала, микроскопирование, работа с чистыми культурами), молекулярно-генетические методы и методы статистического анализа данных. Дизайн проведенных экспериментов основан на анализе литературы и проведенных автором модельных опытах.

**Глава 3** (Результаты и их обсуждение) разбита соискателем логически на ряд подразделов, согласно поставленным задачам исследования. В **подразделе 3.1** приводятся полученные автором подробные результаты по характеристике встречаемости эндофитов на различных злаках, зараженности семян разных видов и их идентификация. **Подразделы 3.2 - 3.3** посвящены описанию коллекции чистых культур эндофитов злаков, в них содержится подробная информация о видовом составе и характеристике полученных изолятов из семян, собранных в Москве и Московской области, их морфотипов и особенностей их развития в культуре. Особо стоит отметить прекрасно иллюстрированный автором материал, позволяющий получить полное представление о микро и макроморфологии этих грибов. В **Подразделе 3.4.** описаны разработанные соискателем молекулярные методы обнаружения наличия эндофитной инфекции в семенах, которая может

оказывать значительное влияние на важные для сельского хозяйства характеристики растений. Рекомендованы специально подобранные праймеры IS-RS-5'/IS-NS-3' для выявления эндофитных грибов в вегетирующих растениях и семенах, что позволяет проводить менее трудоемкую чем в традиционно принятой методике диагностику наличия инфекции в вегетирующих растениях и семенах. **В подразделе 3.6** диссертантом приведены результаты влияния клавиципитальных эндофитов на ростовые характеристики овсяницы гигантской при росте на гидропонике в условиях дефицита азота и фосфора. Проведенный статистический анализ наглядно показал различия между инфицированными и контрольными растениями, на основании которого автор делает выводы о том, что в условиях достаточного количества азота и дефицита по фосфору присутствие эндофитов оказывает отрицательное влияние на биомассу растений.

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

#### **Соответствие содержания автореферата основным идеям и выводам диссертации**

Автореферат диссертации Попковой Е.Г. целиком отражает ее содержание; в нем изложены основные положения работы. Основные результаты исследований обсуждались на нескольких Международных научных конференциях, симпозиумах и форумах. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них 3 в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus, WoS, RSCI.

#### **Замечания и вопросы по работе:**

Однако, несмотря на несомненные многочисленные достоинства работы и при общей, несомненно, положительной оценке диссертации, Попковой Е.Г. имеются следующие замечания и пожелания:

1. Возможно имело смысл в главе 1, при описании текущего таксономического положения клавиципитальных эндофитов злаков, дать более подробное обоснование переноса видов рода *Neotyphodium* в род *Erichloë* и обоснование для молекулярных методов, которые в настоящем времени используются при их идентификации.

2. В качестве замечаний восприятия материала подглавы 1.5 литобзора хотелось бы указать отсутствие структурных формул разных алкалоидов клавиципитальных эндофитов, при одновременно подробном текстовом их описании. Не очень ясно, с какой целью автором в литобзоре приводится такая подробная характеристика заболеваний сельскохозяйственных животных при отравлении алкалоидами в подглаве 1.5.2. Также, для целостного восприятия обзора, имело бы смысл сделать общее краткое заключение по состоянию изученности этой группы грибов в разных аспектах к настоящему моменту.

3. На с. 48 – 49 глава 2 материалы и методы автором допущена неточность при упоминании емкости для выявления мицелия эндофитов. Вместо “баночки от пенициллина” стоит писать “флаконы медицинские, пенициллиновые”.

4. С.58 - Не очень понятно, какой методикой руководствовался диссертант, добавляя при выделении чистых культур эндофитных грибов в среду КГА антибактериальные антибиотики (пенициллин, гентамицин, цефазолин или цефтриаксон) в концентрации 100 мг/л. Указанные концентрации действующего вещества (особенно для гентамицина и цефтриаксона) довольно высоки и могли оказывать действие уже на рост самих грибов.

5. В качестве пожелания развития исследований по влиянию симбиотического взаимодействия грибов и растения-хозяина в условиях дефицита фосфора и азота автору в дальнейшем провести анализ количественного содержания алкалоидов в образцах зараженных эндофит-содержащих растений *Festuca gigantea*, а также у штаммов эндофитных грибов, взятых для модельного опыта.

### **Заключение**

Диссертация Попковой Екатерины Геннадиевны, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.12 – микология», по актуальности темы, современному методическому уровню экспериментов, научной новизне и практической значимости результатов, объему выполненных исследований, в которых получены научно-обоснованные и статистически достоверные данные является законченной научно-квалификационной работой. В диссертационной работе содержится решения ряда прикладных научных задач, имеющих существенное значение для микологии и потенциального использования клавиципитальных эндофитов в биотехнологии.

Работа соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее содержание - паспорту специальности «03.02.12 – микология».

По своей научной новизне и практической значимости выполненное диссертационное исследование соответствует требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.02.12 – «Микология» (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, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

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.

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.02.12 – Микология; 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Контактные данные: тел.

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», к.х.н.

О.В. Кисиль