

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Цавкеловой Елены Аркадьевны
на тему: «Структурно-функциональные особенности микробных сообществ эпифитных орхидей: биоразнообразие, роль и биотехнологическая значимость ассоциативных микроорганизмов», представленной на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.03 – «микробиология» и 03.01.06 – «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»

Интенсификация сельского хозяйства и истощение природных ресурсов, связанные как со значительным антропогенным вмешательством, так и климатическими изменениями, приводят к развитию глобального экологического кризиса и дестабилизации биосферы. В связи с этим наиболее остро стоят вопросы сохранения биоразнообразия и поиск стратегий для увеличения численности исчезающих и редких видов растений, их адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды. Особое внимание в настоящее время уделяется изучению микробных сообществ, формирующих ассоциации с растениями, а также механизмов взаимовыгодного взаимодействия между растениями и колонизирующими их микроорганизмами, направленных на улучшение роста, развития и продуктивности растения-хозяина. Учитывая, что бактерии обладают гибким метаболизмом, который зачастую позволяет им приспосабливаться к различным, в том числе экстремальным и враждебным условиям окружающей среды, именно микроорганизмы, которые многочисленно и широко представлены в почве, становятся основными участниками по поддержанию жизнедеятельности и стабильного и сбалансированного сосуществования растительно-микробных консорциумов. В связи с этим всё более востребованными становятся фундаментальные и прикладные исследования по поиску ростстимулирующих бактерий и микромицетов, а также расширению областей их применения в биотехнологии.

В представленной к защите диссертационной работе Е.А. Цавкеловой проведено всестороннее исследование фитомикробиома эпифитных орхидей. Эти растения существенно отличаются по особенностям своей биологии, в том числе строению корневой системы, от большинства растений и в то же время, представляют одно из самых многочисленных семейств однодольных растений.

Для решения поставленной цели по структурно-функциональному анализу ассоциативных микробных сообществ эпифитных орхидей и изучению механизмов растительно-микробных взаимодействий автором работы был использован широкий набор традиционных и современных методов микробиологии, цитологии и молекулярной биологии, а также ботаники и физиологии растений. Хотелось бы отметить проведённое автором изучение бактериальных сообществ ризопланы воздушных и субстратных корней на примере *Dendrobium moschatum* с помощью сравнительного анализа качественного и количественного распределения доминирующих и минорных популяций бактерий, при котором проведено выделение отдельных колоний и их идентификация, а также профилирование сообществ методом глубокого секвенирования на платформе Illumina.

Несмотря на то, что основная работа проведена с различными видами орхидейных эпифитных орхидей, преимущественно представителями рода *Dendrobium*, также были изучены дикорастущие тропические виды *Pholidota articulata* и наземная *Paphiopedilum appletonianum*. Особый интерес при изучении состава цианобактериальных микробных сообществ вызывают такие объекты как безлистные эпифитные орхидеи *Microcoelia moreauae* и *Chiloschista parishii*. Установлена роль и важность цианобактериальных сообществ как основного дiazотрофного структурного компонента, состоящего преимущественно из азотфиксирующих представителей микросимбионтов.

Автором проведено комплексное изучение отдельных микроорганизмов и формируемых ими микробных сообществ на корнях и в филлоплане эпифитных орхидей, исследованы локализация, механизмы взаимодействия и факторы, определяющие "коммуникацию" между растением-хозяином и ассоциативной микробиотой. Значительная

часть работы посвящена изучению фитогормонов, образуемых грибами и бактериями, путям их биосинтеза и регуляции активности генов, ответственных за их образование. В работе отражены различные возможности для биотехнологического применения выделенных микроорганизмов, а именно получение новых продуцентов вторичных метаболитов на примере трансгенных представителей грибов из рода *Fusarium* и использование гидролитической активности грибов *Trichoderma* а также биомассы *Anabaena* при получении альтернативных источников биотоплива. Подобные исследования несомненно актуальны и востребованы в современной прикладной микробиологии.

Важным достижением работы является разработка и оптимизация стратегии инокуляции семян орхидных ростстимулирующими бактериями, которые значительно повышают всхожесть и ускоряют развитие семян этих растений в искусственных условиях культивирования, что важно для сохранения биоразнообразия популяций редких видов и увеличения их численности. Важным результатом также является доказательство отсутствия видоспецифичности или зависимости растения от аборигенных изолятов бактерий, что является фактором, затрудняющим использование микоризообразующих грибов для симбиотического проращивания орхидей. Выделенные из ризосферы других растений активные рост-стимулирующие культуры, принадлежащие к родам *Pseudomonas* и *Klebsiella*, оказались не менее эффективными, чем аборигенные изоляты эндофитных бактерий. Значимым является установление факторов, определяющих возможность применения таких ростстимулирующих бактерий: способность к биосинтезу оптимальных количеств биологически-активных ауксинов и отсутствие формирования чрезмерного экзополисахаридного матрикса.

Значительная часть работы посвящена изучению молекулярно-генетических механизмов биосинтеза основных стимуляторов роста растений у различных видов представителей рода *Fusarium*, в том числе у выделенного с корней *F. ptiliferatum*. Полученные автором результаты впервые описывают не только механизмы образования фитогормонов и регуляции активности генов, ответственных за биосинтез гиббереллинов и ауксинов у этих грибов, но и раскрывают особенности этих путей и образования конечных продуктов в составе широкого спектра фитогормонов, отличающиеся на уровне вида и даже штамма. Полученные результаты подтверждают тот факт, что стратегия взаимодействия микроорганизмов с растением в значительной мере определяется качественным и количественным составом образуемых вторичных метаболитов гормональной природы.

В работе впервые проведен сравнительный анализ состава бактериальных сообществ, заселяющих оранжерейные и дикорастущие виды орхидей. Показано, что количественное распределение микроорганизмов в ризоплане воздушных корней эпифитов значительно выше, чем на субстратных корнях, что подтверждает важность ассоциативной микробиоты именно на воздушных корнях. Автором многолетними исследованиями показана важная экологическая роль веламена – особой структуры воздушных корней, создающей комфортабельную среду для ассоциативных микроорганизмов. Уместным и оригинальным решением было применить конфокальную лазерную сканирующую микроскопию для наблюдения в динамике за проникновением и заселением корневой поверхности и внутренних тканей эндофитными бактериями. Впервые удалось показать отличия, связанные с возможностью проникновения эндофитных бактерий по всей поверхности корня, покрытого веламеном, в отличие от изученных в этом отношении растений, произрастающих в почве, у которых зачастую их проникновение происходит через корневые волоски. Принципиальным является определение роли веламена для понимания смещения зоны максимальной микробной активности от ризосферы (в случае большинства растений) к ризоплане воздушных корней.

Автором проведён широкий скрининг выделенных микроорганизмов на их способность к биосинтезу ауксинов. Примечательно, что даже при стимуляции экзогенным триптофаном, уровень биосинтеза основного ауксина – индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) не превышал у большинства исследованных изолятов оптимальных значений 20-60 мкг/мл,

при которых проявляются положительные эффекты стимуляции роста как у растений, так и бактериальных популяций. Это было показано автором впервые на примере культур родов *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, *Rhizobium* и *Microbacterium*. Эти данные показывают, что фитомикробиом эпифитных орхидей состоит преимущественно из микроорганизмов, обладающих рост-стимулирующими свойствами. Важным для понимания растительно-микробных взаимодействий является то, что эволюционно-консервативная природа рост-стимулирующего гормона ИУК двунаправлена и на растение-хозяина, и на популяции бактерий, колонизирующих его. При этом растение сохраняет за собой определенный контроль за развитием бактериальных популяций за счёт выделения антимикробных соединений. Автор использовал оригинальный подход для подтверждения концепции о том, что растение осуществляет селекцию выгодных для себя бактериальных популяций.

При изучении состава микробных популяций установлены достоверные отличия в составе бактериальных популяций воздушных корней, состоящих преимущественно из микробактерий не типичных в составе доминирующих популяций у почвенных сообществ. Среди выделенных культур у дикорастущих растений выявлены мицелиальные представители стрептомицетов и энтеробактерий, не обнаруженные у оранжерейных орхидей. Негативное влияние этих микроорганизмов было показано в биотестах (угнетение роста черенков фасоли и развития проростков семян орхидей). Проведённое автором сравнение фитомикробиомов оранжерейных и дикорастущих растений показало, что при оптимальных условиях искусственного культивирования, растения получают возможность к формированию наиболее благоприятного микробного сообщества.

Известные ростстимулирующие ризобактерии, наиболее часто применяемые для стимуляции роста сельскохозяйственных растений, такие как *Azospirillum* или *Rhizobium* нельзя использовать для проращивания орхидей *in vitro* из-за чрезмерного образования этими культурами экзополисахаридного матрикса, подавляющего прорастание семян. Проведенное автором исследование поможет в выборе PGPR культур для изучения совместного проращивания семян не только орхидей, но и других растений. Бактерии рода *Sphingomonas* оказались не только в составе доминирующих бактериальных популяций изученных растений, но и одними из наиболее эффективных, стимулирующих прорастание и развитие проростков орхидных.

В диссертационной работе Е.А. Цавкеловой разработаны теоретические обоснования и приведены практические подтверждения таким аспектам взаимодействия и взаимовлияния как триггеры роста и развития микробных популяций и растения, а также коммуникация с помощью сигнальных молекул внутри консорциума микроорганизмов, формирующих фитомикробиом растения. Исследование вносит существенный вклад в фундаментальное понимание растительно-микробных взаимодействий.

Достоверность и новизна полученных результатов очевидны. Выводы чётко сформулированы, корректны и вытекают из результатов, изложенных в автореферате, соответствуют цели исследования и поставленным задачам. Положения, выносимые на защиту, убедительно подтверждены результатами и выводами диссертационной работы. Текст автореферата дополнен высокоинформативными рисунками и таблицами. Основные результаты и выводы диссертационной работы отражены в 38 печатных работах, подавляющее большинство из которых – в высокорейтинговых журналах, в том числе 31 статье в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. Практическая сторона разработок отражена в полученном автором патенте.

Мелкие редакционные неточности и дискуссионные положения не снижают значимости полученных автором данных.

Принимая во внимание актуальность темы, высокий методический уровень работы, многогранность, объём и количество результатов, их теоретическую и практическую значимость, можно с убедительностью сказать, что Е.А. Цавкеловой получены новые данные, разработаны новые подходы и направления в исследовании растительно-микробных

взаимодействий. Диссертационная работа Е.А. Цавкеловой на тему «Структурно-функциональные особенности микробных сообществ эпифитных орхидей: биоразнообразие, роль и биотехнологическая значимость ассоциативных микроорганизмов» полностью отвечает требованиям, установленным в Положении о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а 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)».

Главный научный сотрудник,
и.о. заведующего лабораторией ризосферной микрофлоры
ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии",
доктор биологических наук

А.А. Белимов

Дата подписания: 27.04.2021

Сведения об авторе отзыва:

Белимов Андрей Алексеевич

тел.: 7(812)4705100 (рабочий), e-mail: belimov@rambler.ru

Учёная степень: доктор биологических наук

Специальность, по которой защищена диссертация: 03.02.03 – микробиология

Место работы:

196608, г. Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", лаборатория ризосферной микрофлоры.

Подпись Белимова А.А. заверяю:

Ученый секретарь

ФГБНУ ВНИИСХМ, к.б.н.

Адрес: ФГБНУ ВНИИСХМ, ш. Подбельского, д. 3, Пушкин, 196608, Санкт-Петербург.



Алисова С.М.