

УТВЕРЖДАЮ
Ректор ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ

Член. корр. РАН, д.э.н. Евгений Владимирович Рудой
17.05.2024 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный аграрный университет» на диссертационную работу Салимовой Дилары Ринатовны "ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ГРИБОВ РОДА *ALTERNARIA* С ЭНТОМОТОКСИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ" представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.18. - Микология.

Актуальность проблемы. В настоящее время для защиты сельскохозяйственных растений от повреждений, наносимых насекомыми-вредителями используют современные экологические чистые подходы, которые позволяют снизить интенсивность применения химических инсектицидов. Такие подходы включают: создание устойчивых сортов, использование естественных врагов насекомых и применение микробиологических препаратов. Основная часть коммерческих грибных энтомопатогенных препаратов создана на основе живой культуры энтомопатогенов рода *Beauveria* и *Metarhizium*, и почвенных микромицетов рода *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* и *Trichoderma*. Однако трофические и конкурентные связи насекомых с микромицетами, в частности фитопатогенными, подразумевают наличие у них метаболитов с инсектицидными свойствами. К настоящему времени, работы, выполняемые в области изучения прямого (за счет энтомотоксического или репеллентного действия) или косвенного (снижая качество растительного субстрата, подавляя иммунитет и симбиотическую микрофлору насекомых) действия вторичных метаболитов фитопатогенных грибов на жизнеспособность, развитие и плодовитость членистоногих, единичны. Известно, что вторичные метаболиты фитопатогенных грибов рода *Alternaria* spp. обладают широким спектром действия на различные объекты, включая растения, бактерии, грибы, членистоногих и другие организмы. Это определяет интерес к токсинам *Alternaria* spp., и их энтомотоксическим свойствам с точки зрения, не только изучения их антагонистического влияния в рамках трофических связей, но и поиска экологически безопасных методов борьбы с вредными насекомыми.

Цель исследований заключается в выделении и характеристики вторичных метаболитов различных штаммов трех видов грибов рода *Alternaria* (*A. japonica*, *A. sonchi*, *A. tenuissima*), обладающих энтомотоксическими свойствами.

Общая характеристика диссертационной работы. Диссертационная работа изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, выводов, заключения, списка публикаций по теме диссертации, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 33 рисунками в основном тексте и 5 — в приложении, 4 таблицы в основном тексте и 12 — в приложении. Библиография включает 246 источников, из них 222 на иностранном языке.

Личный вклад автора заключался в подготовке и проведении лабораторных исследований, учетов и наблюдений, а также анализ и интерпретация полученных результатов.

Научная новизна. Впервые изучен набор вторичных метаболитов в экстрактах из культур грибов *A. japonica* и обнаружены биологически активные соединения – брассициколин А, гидро- и дигидробрассициколин А и фоменин А. Установлено, что *A. japonica* не образует токсины мелкоспорных видов рода *Alternaria*. Показана возможная связь компонента экстрактов *A. japonica* (дигидробрассициколин А) с их энтомотоксической активностью в отношении обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* (Rond.) и гусениц большой вошинной огневки *Galleria mellonella* (L.). Впервые охарактеризованы энтомотоксические свойства тенуазоновой кислоты в отношении нескольких видов членистоногих (паутинного клеща *Tetranychus urticae*, вошинной огневки *G. mellonella*, домового сверчка *Acheta domestica*, личинок жука-чернотелки *Zophobas morio*). Впервые установлен синергетический эффект в смертности личинок *G. mellonella* при совместной обработке энтомопатогеном *B. bassiana* и тенуазоновой кислотой, а также показано воздействие тенуазоновой кислоты на параметры гуморального иммунитета и активности ферментов детоксицирующей системы у личинок *G. mellonella*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Гриб *A. japonica* охарактеризован как продуцент брассициколина А, гидро- и дигидробрассициколина А и фоменина А. На примере типичного микотоксина мелкоспорных *Alternaria* spp. – тенуазоновой кислоты, показано прямое (гибель) и косвенное (замедление развития, снижение плодовитости) действие в отношении различных членистоногих. Показана способность микотоксина фитопатогена *A. tenuissima* подавлять иммунитет у гусениц большой восковой моли *G. mellonella*. Разработаны методические рекомендации по выделению тенуазоновой кислоты, которые включают условия и сроки культивирования биоматериала, фракционирование экстракта методами колоночной хроматографии с указанием условий хроматографирования.

Обоснованность и достоверность полученных результатов. Все опыты проведены с необходимым числом повторений, проанализированы методами параметрической и непараметрической статистики. Результаты исследований были представлены на российских и международных конференциях и отражены в восьми печатных публикациях, в том числе четыре из них в журналах, рекомендованных ВАК РФ, четыре – в других научных изданиях и сборниках, материалах съездов и конференций.

В первой главе (обзор литературы) дан анализ состояния изученности проблемы. Рассмотрены работы по использованию грибов рода *Alternaria* как продуцентов биологически активных вторичных метаболитов. Рассмотрены типы возможных антагонистических взаимоотношений грибов рода *Alternaria* и насекомых. Описаны различные метаболиты грибов, и проведен анализ литературы, связанной с тенуазоновой кислотой, как модельным токсином, для изучения энтомотоксических свойств грибных метаболитов.

Во второй главе описаны условия и методики проведения исследований. Объектами исследования являлись девять штаммов трех видов грибов *Alternaria* spp.: *A. japonica*, *A. sonchi*, *A. tenuissima*. Молекулярная идентификация штаммов *A. japonica* и *A. tenuissima* была проведена по анализу таксономически информативных локусов ДНК: фактора элонгации трансляции 1 α (EF-1 α) и области внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS). Для достижения цели диссертационного исследования были применены общепринятые микологические, молекулярно-генетические методы, различные методы биотестирования и методы физико-химического анализа (высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, УФ- и ЯМР- спектроскопия). Статистическую обработку полученного материала проводили с помощью современных программ (STATISTICA 12.0, SigmaPlot 14.0).

В третьей главе представлены полученные изыскателем данные по биологической активности и о химическом составе метаболитов грибов *A. japonica*, *A. tenuissima* и *A. sonchi*. В рамках исследований выполнена идентификация и описаны физиолого-биохимические свойства штаммов. По результатам молекулярного анализа, морфологическим признакам и хемотаксономическим маркерам (комплексе вторичных метаболитов) показано четкое отличие четырех российских штаммов *A. japonica* от *A. tenuissima*. Изучено влияние состава питательной среды и способа культивирования на образование метаболитов исследуемых штаммов, а именно описан спектр биологической активности экстрактов, энтомотоксическая, фитотоксическая, антибиотическая, цитотоксическая активности. Проведен анализ профиля метаболитов из экстрактов и оценка взаимосвязи типов активности и состава экстрактов. В экстрактах *A. japonica* идентифицированы брассициколин А, гидробрассициколин А, дигидробрассициколин А, фоменин А. Штаммы *A. japonica* не образовывали микотоксины мелкоспоровых *Alternaria* spp. (альтернариол, его монометилловый эфир, тенуазоновая кислота, тентоксин), которые были идентифицированы в культурах *A. tenuissima*.

В четвертой главе представлены результаты исследований по выделению и идентификации тенуазоновой кислоты из фильтрата культуры *A. tenuissima*. В проведенных экспериментах установлено, что контактно-кишечную токсичность в отношении обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* с эффективностью более 50 % продемонстрировали 8 % экстрактов. Более 30% из изученных экстрактов проявили остро-контактную токсичность в отношении гусениц большой вощинной огнёвки *Galleria mellonella* с кумулятивной смертностью более 50%. Выявлена возможная взаимосвязь энтомотоксической активности в отношении гусениц *G. mellonella* с содержанием в экстрактах *A. japonica* - дигидробрассициколина А, *A. tenuissima* – тенуазоновой кислоты. Установлен, что чувствительность злаковой тли *S. graminum* к экстрактам из *A. japonica*, *A. sonchi* и *A. tenuissima* может быть связана с содержанием в них фоменина А, хлормонилининовой кислоты В и тентоксина, соответственно.

В пятой главе представлены полученные данные экспериментов по изучению реакций клеточного и гуморального иммунитета гусениц *Galleria mellonella* при действии тенуазоновой кислоты. Показано, что тенуазоновая кислота в концентрации 20 мкг на личинку обладает острой контактной токсичностью в отношении личинок *G. mellonella* и *Zophobas morio*, с медианной выживаемости, соответственно, 7 и 4 суток. Тенуазоновая кислота в 0.1 %-ной концентрации обладает слабой контактно-кишечной токсичностью в отношении *Schizaphis graminum* и *Tetranychus urticae*, однако полностью ингибирует репродуктивную функцию самок паутиного клеща. Тенуазоновая кислота с ИК₅₀ 25 мкг/мл в 5 раз менее токсична, чем боверицин. Также показано, что тенуазоновая кислота повышает восприимчивость гусениц *G. mellonella* к грибной инфекции *Beauveria bassiana*. Добавление тенуазоновой кислоты в корм личинок *G. mellonella* не влияло на клеточный иммунитет, однако повышало уровень фенолоксидаз и ферментов детоксицирующей системы в гемолимфе насекомых.

При анализе диссертационной работы Салимовой Дилары Ринатовны возникли следующие замечания и пожелания рекомендательного характера:

1. Необходимо отметить, что одной из задач исследования (Стр. 6) являлось «исследовать влияние состава питательного субстрата на образование эндо- и экзогенных метаболитов исследуемых штаммов». Решению данной задачи посвящен

раздел результатов исследования (Стр.45-54), однако результаты данного блока работ не отражены в выводах.

2. Следует отметить, что выборка насекомых «для определения биологической активности - остро-контактного действия путем инъекции экстрактов» была минимальна для подобного рода исследований (10 особей на вариант) (Таблицы А1-А12, приложение А). Следует рекомендовать использовать большие выборки, минимум 30 насекомых на вариант. Кроме того, в данных таблицах указана «кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции» и не представлены данные смертности в контрольном варианте – при инъекции растворителя для экстракции.
3. В разделе методы пункт 2.7.2., 2.7.3. и 2.7.4. не указаны выборки насекомых на вариант.
4. Стр.30. Автор провел анализ нуклеотидных последовательностей грибов и провел их депонирование в базу NCBI. В работе имеются ссылки на задепонированные фрагменты (Таблица 3). Однако, следовало, также привести нуклеотидные последовательности в приложении к диссертации.
5. Стр. 37. Не совсем ясно какую концентрацию фенилтиомочевины использовали для остановки процесса меланизации гемолимфы.
6. Раздел 3.3.1. Несмотря на то что полученные данные подробно представлены в виде таблиц в Приложении (А), следовало бы добавить иллюстрационный материал в основной текст диссертации.
7. Раздел 4.2.2. Остро-контактная активность. В материалах и методах (стр. 34) не указано, что было введено личинкам в качестве контрольного варианта. Необходимо обратить внимание на высокий процент гибели личинок *Galleria mellonella* в контрольном варианте при инъекции (Стр. 90). Автор не обсуждает данный эффект. Кроме того, автор указывает на то, что «погибшие гусеницы меланизировались» - такой эффект мог быть получен в следствии действия растворителя и активации меланогенеза.
8. Стр. 101. Автор указывает что "Основная роль ГСТ и ЭСТ в организме насекомых заключается в инактивации токсичных продуктов, образующихся при токсикозах, вызванных инсектицидами ". Вместе с тем, следует уточнить, что данные ферменты играют важную роль в обычном метаболизме насекомых, а их вклад в инактивацию ксенобиотиков и продуктов острого токсикоза является дополнительной функцией.
9. В диссертационной работе в разделе «Материалы и методы» (стр. 27) указано, что штамм *Alternaria japonica* 181-011 выделен из плода редьки без указания региона, при этом, в опубликованных автором статьях (Идентификация и токсикологическая характеристика штаммов *Alternaria japonica*, 2021) указано, что данный штамм был выделен в Московской области. Автору следует уточнить точное происхождение данного штамма.

Заключение

Представленная кандидатская диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании исследований содержится решение задачи, имеющей значение для развития микологии. Впервые изучен набор вторичных метаболитов в экстрактах из культур *A. japonica* и обнаружены биологически активные соединения – брассициколин А, гидро- и дигидробрассициколин А и фоменин А. Установлено, что *A. japonica* не образует токсины мелкоспоровых видов рода *Alternaria*. Показана возможная связь компонента экстрактов *A. japonica* (дигидробрассициколин А) с их энтомотоксической активностью в отношении обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* и гусениц большой вошинной огневки *Galleria mellonella*. Работа Салимовой Д. Р. выполнена на высоком профессиональном уровне. Главным достоинством этой работы является системный и оригинальный подход к проведению исследований. Впервые

охарактеризованы энтомотоксические свойства тенуазоновой кислоты в отношении следующих членистоногих – паутиного клеща *Tetranychus urticae* Koch, большой вошинной огневки *G. mellonella*, домового сверчка *Acheta domesticus*, личинок жука-чернотелки *Zophobas morio*. Впервые установлен синергетический эффект в смертности гусениц *G. mellonella* при совместной обработке энтомопатогеном *Beauveria bassiana* и тенуазоновой кислотой. Впервые показано влияние тенуазоновой кислоты на параметры иммунитета и активность ферментов детоксицирующей системы в гемолимфе гусениц *G. mellonella*.

Текст диссертации изложен согласно общепринятой терминологии, автореферат и опубликованные статьи отражают содержание диссертации. Выводы вытекают из представленного в диссертации материала. Указанные замечания не умаляют достоинства представленной работы. Диссертационная работа по актуальности и научно-практической значимости отвечает требованиям ВАК РФ. Работа отвечает требованиям п.9 "Положения о присуждении ученых степеней" утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 года, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.18. - Микология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании лаборатории биологической защиты растений и биотехнологий Новосибирского ГАУ. Протокол № 1 от 13 Мая 2024 года.

Отзыв подписал

Доктор биологических наук (03.02.05 - энтомология),
Заведующий Лабораторией Биологической Защиты
Растений и Биотехнологии, Профессор Кафедры Защиты
растений Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Новосибирский государственный аграрный университет»

Иван Михайлович
Дубовский

Кандидат биологических наук (03.02.05 - энтомология),
в.н.с. Лаборатории Биологической Защиты Растений и
Биотехнологии, Доцент Кафедры Защиты растений
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Новосибирский государственный аграрный университет»

Екатерина Валерьевна
Гризанова

Кандидат сельскохозяйственных наук (4.1.3. - Агрохимия,
агрочвоведение, защита и карантин растений), н.с.
Лаборатории Биологической Защиты Растений и
Биотехнологии Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Новосибирский государственный аграрный
университет»

Масленникова Владислава
Сергеевна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный аграрный университет»
Почтовый адрес: 630039, Добролюбова 160, Новосибирск, Россия
Тел.: (383) 267-38-11, факс: 264-26-00 E-mail: rector@nsau.edu.ru

