

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу **Шамрайчук Ирины Леонидовны** «Внеклеточная активность пептидаз сапротрофных и патогенных мицелиальных микромицетов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.18 – Микология

Актуальность темы диссертационной работы

Экзоферменты грибов, условия их продуцирования и способы стимуляции их выделения во внешнюю среду многие десятилетия интересуют как практиков в сфере биотехнологий, так и фундаментальную науку. Гидролитические ферменты, к которым относятся пептидазы, обеспечивают питание грибов разной трофической приуроченности, их адаптацию к меняющимся условиям среды, нередко они становятся прекурсорами токсинов, опасных для растений и животных. Роль и значение внеклеточных грибных пептидаз в развитии процессов, протекающих как при нормальном физиологическом состоянии живых систем, так и при патофизиологическом, трудно переоценить. А установление роли протеаз в регуляции активности патогенных микроорганизмов открывает новые возможности в направлении поиска терапевтических агентов для лечения некоторых инфекционных заболеваний и предупреждения развития эпифитотий в растительных сообществах. Однако, механизмы регуляции образования грибами таких ферментов как пептидаз, оптимальные условия их продуцирования и даже спектр видов микромицетов, для которых можно было бы обсуждать значимую продуктивность в экологическом и физиологическом аспектах, к настоящему времени недостаточно изучены. В этой связи тема и направления исследований в диссертации Ирины Леонидовны Шамрайчук на тему «Внеклеточная активность пептидаз сапротрофных и патогенных мицелиальных микромицетов» представляется весьма актуальной, важной как для решения фундаментальных научных вопросов, так и для практических разработок,

поиска новых технологических подходов к использованию и производству протеаз.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

Диссертация содержит элементы несомненной новизны, отличается широким охватом изучаемых видов и штаммов микромицетов, попыткой найти взаимосвязь между трофической приуроченностью и активностью внеклеточных пептидаз. Впервые в выбранном направлении исследован в одной работе широкий спектр видов микромицетов.

В числе решаемых задач стоит оценка влияния на протеолитическую активность мицелиальных микромицетов большого набора факторов, среди которых возраст культуры, pH среды культивирования, концентрация кислорода, тип источника азотного питания. Охарактеризованы спектры и внеклеточная активность пептидаз у 26 штаммов ряда видов микромицетов, в том числе фитопатогенных, при их росте на среде с белковым индуктором, при этом выявлены новые перспективные продуценты с наибольшей активностью. Новым и интересным фактом оказалось то, что при исследовании факторов влияния на секретируемую протеолитическую активность у фитопатогенных видов *Botrytis cinerea* Pers. и *Fusarium roseum* Link установлена их зависимость от наличия в среде фракций клеточных стенок высших растений.

Выявлена последовательность вклада разных групп пептидаз в интегральную внеклеточную протеолитическую активность *B. cinerea*, изучены динамические аспекты и экспериментально доказаны ферментативные маркеры определённых возрастных характеристик культуры.

Особый интерес представляет анализ взаимосвязи синтеза меланина и внеклеточной активности пептидаз у фитопатогенного вида *Alternaria linariae* (Neerg.) E.G. Simmons. Выявлено, что у агрессивных штаммов этого вида характерна высокая активность трипсин-подобных ферментов, которые можно считать участниками фитопатогенного процесса.

Оценка достоверности полученных результатов, степень обоснованности научных положений, выводов диссертации

Достоверность результатов и выводов диссертационного исследования подтверждается значительным объемом экспериментальных данных, полученных с применением современных биохимических, микробиологических и физико-химических методов. Методическая часть подробно описана в разделе «Материалы и методы исследования», где указано, что исследования проводились в трехкратной повторности. Формулировку, касающуюся степени достоверности результатов в автореферате и диссертации, желательно было бы получить обосновать. Сейчас она звучит так: «достоверность результатов определяется профессионализмом автора, точностью воспроизведения экспериментов и точностью использованных приборов». Информации о точности приборов и оценок неопределенностей измерений не приводится, да и сложно было ожидать в такой объемной экспериментальной работе. Поэтому, стоило более аккуратно сформулировать этот обязательный раздел работы и конкретно указать, какая статистическая обработка результатов проводилась.

Результаты проиллюстрированы большим количеством рисунков, кинетическими кривыми, рассмотрено влияние всех упомянутых в задачах факторов, обсуждение результатов проведено с привлечением значительного числа научных публикаций по тематике исследования.

Положения, выносимые на защиту, обоснованы, определяются результатами и соответствуют цели и задачам исследования. Выводы логично вытекают из результатов, положения диссертации теоретически и экспериментально обоснованы.

Публикации и апробация результатов исследования

Основные положения и результаты диссертационной работы опубликованы в 10 научных работах, в том числе вышли в печать 4 статьи в рецензируемых журналах, подготовлены доклады и опубликованы 5 тезисов докладов. В 8 работах, включая 3 статьи в рецензируемых журналах,

индексируемых в базах данных WoS, Scopus, RSCI, вклад автора является определяющим, в 3-х статьях Ирина Леонидовна указана первым автором.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Содержание автореферата диссертации в полной мере отражает сущность диссертационной работы.

Цель, задачи, положения, выносимые на защиту, заключение и выводы, приведенные в автореферате, соответствуют таковым в диссертации.

Общую характеристику, структуру и оформление диссертации я хотела бы описать кратко, остановившись на некоторых особенностях.

В построении работы нет отклонений от традиционного плана. Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы.

Материал диссертации изложен на 123 страницах, включает обилие (53) иллюстраций. Список литературы включает 192 источника, из них 5 на русском языке.

Введение включает все необходимые разделы, а именно, актуальность темы, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, положения, выносимые на защиту, количество публикаций по теме диссертации. Также определены цель и задачи исследования.

В главе «Обзор литературы» (треть объема текста диссертации) автор приводит анализ литературных данных, останавливаясь кратко на факторах и стратегии колонизации грибами растительных тканей. Но довольно подробно описывает классификацию протеолитических ферментов (местами рубрики имеют непривычные пятизначные цифровые обозначения - 1.2.2.2.5 и т.п.). Поскольку сравнивается в экспериментальной части работы продукция пептидаз у сапротрофных и патогенных организмов, то хорошо бы уделить побольше внимания этой литературе.

Особое внимание, на мой взгляд, заслуживает связь меланиногенеза и протеолитической способности грибов, в связи с анализом факторов вирулентности у некоторых меланизированных исследуемых видов. К сожалению, выпал из поля зрения автора обзор наших коллег Гесслер Н.Н., Егоровой А.С., Белозерской Т.А. «Меланинсодержащие грибы в экстремальных условиях» (2014). В котором рассмотрены не только вопросы участия этих пигментов в приспособляемости к условиям среды, их роль в патогенезе, но и пути синтеза, предшественники и прочие интересные биохимические аспекты взаимодействия с многообразными грибными метаболитами, включая ферменты.

В главе «Материалы и методы исследований» дается общая характеристика экспериментального материала, указано, что эти грибы из разных эколого-трофических групп, из разных коллекций. Методы как микологические, так и биохимические описаны достаточно подробно.

В главе «Результаты и их обсуждение» подробно изложены результаты исследований. Приведены данные по общей внеклеточной протеолитической активности и вкладу в нее различных групп секретлируемых пептидаз у разных штаммов мицелиальных грибов, выделены особо спектры специфической протеолитической активности культур микромицетов, рассмотрены факторы внешней среды, влияющие на секрецию грибных пептидаз, все, что заявлено в задачах. Затем охарактеризованы пептидазы отдельных представителей родов *Alternaria*, *Fusarium*, *Trichoderma*, большое внимание уделено виду *Botrytis cinerea*.

На основании обзора литературы и представленных экспериментальных данных автор сформулировала «Заключение» диссертации, где автор обобщает их, делая акцент на целесообразности изучения вклада пептидаз в проявление фитопатогенных свойств у грибов, что необходимо для разработки рациональных методов антигрибной защиты растений. Тем самым справедливо еще раз подчеркивает обоснованность цели работы -сравнение патогенных и сапротрофных продуцентов пептидаз.

На основании своих экспериментов констатирует, что грибы-фитопатогены способны секретировать как кислые и нейтральные, так и щелочные пептидазы. Приводит убедительные данные (на примере *B. cinerea*) о том, что хотя общая протеолитическая активность изученных штаммов выявляется при всех исследованных значениях pH среды (от кислых до основных), значение pH может выступать как фактор, индуцирующий ферментативную активность. Это свидетельствует, по мнению автора, с которым трудно не согласиться, о гибкости протеолитических систем грибов-фитопатогенов. В природных условиях их ферменты могут функционировать при разных значениях pH среды.

Вклад отдельных пептидаз в ферментативный пул культуральной жидкости, в общую протеолитическую систему в частности, *B. cinerea* можно разделить во времени появления по достижению их максимума. Это показано при анализе появления аминопептидаз, субтилизин- и трипсин-подобных ферментов.

Отдельный блок в заключении, как и выводах, посвящен вопросам причастности пептидаз некоторых мицелиальных грибов выступать в качестве участников процесса патогенеза на определенных его этапах, таких как проникновение гриба-паразита в ткани организма-хозяина, выживание в новых условиях. У сильных патогенов, наряду с пептидазами, в качестве факторов вирулентности могут рассматривать и другие метаболиты – ингибиторы пептидаз и меланиновые пигменты.

Выводы носят описательный характер полученных результатов, не содержат конкретных цифр и данных, но в целом в краткой форме отражают ответы на все поставленные задачи, соответствуют им.

Завершая анализ диссертационной работы, следует сказать, что автором проведен большой объем экспериментальных исследований, получены интересные данные, которые апробированы в статьях и на научных форумах. В целом диссертационная работа написана грамотно, хорошим научным языком, в достаточной мере иллюстрирована.

Таким образом, актуальность темы исследования, ее новизна, большой объем экспериментальных данных, а также анализ результатов с привлечением опубликованной литературы, позволяют положительно оценить диссертационную работу И.Л. Шамрайчук

К автору диссертации возникли следующие вопросы:

1. Поскольку опыты проводились в трехкратной повторности, то почему ни в одном разделе не приводятся результаты статистической обработки экспериментальных данных?
2. Возможно ли было обобщить на основе имеющихся данных видоспецифические особенности, касающиеся продукции пептидаз у нескольких штаммов одного вида? Ведь некоторые виды (например, из родов *Alternaria*, *Fusarium*) в работе представлены не одним штаммом, а по 2-3 и более.

Замечаний к работе немного. Одни из них носят терминологический характер, в частности по тексту порой происходит смешение понятий «патогенность» (характеристика генотипа, наследственное свойство вида гриба) и «вирулентность» (степень патогенности, мера патогенности, зависящая от условий), добавляется еще иногда термин «агрессивность», которая, экспериментально не доказывается, а используется, вероятно, интуитивно, на основе скорости роста.

К сожалению, в диссертации не все цитируемые источники приводятся в списке литературы, например, отсутствуют библиографические ссылки на работы Бут и др., 2005 (стр. 29), Babitskaya et al., 2000 (стр. 53)

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.18 «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.

Таким образом, соискатель Шамрайчук Ирина Леонидовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических по специальности 1.5.18 «Микология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,

профессор кафедры земельных ресурсов и оценки почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Терехова Вера Александровна

01.12.2022

Контактные данные:

тел.: , e-mail:

Специальности, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:

03.00.24 (в настоящее время - 1.5.18) «Микология» и 03.00.16 (в настоящее время - 1.5.15.) «Экология» (биологические науки).

Адрес места работы:

119234 Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения.

Тел.: , e-mail:

Подпись В.А. Тереховой удостоверяю
и.о. декана факультета почвоведения,
член-корр. РАН

П.В. Красильников