

В диссертационный совет 35.2.035.01,
созданный на базе
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и
инженерии им. Н.И. Вавилова»
(ФГБОУ ВО Вавиловский университет)

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Широких Ирины Геннадьевны на диссертационную работу Ткаченко Оксаны Викторовны на тему «Бактерии рода *Azospirillum* и их липополисахариды как фактор стимулирования морфогенеза пшеницы и картофеля в культуре тканей *in vitro*», представленную на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 1.5.6. Биотехнология (сельскохозяйственные науки)

За последние полвека в области культуры изолированных клеток, тканей и органов растений были достигнуты значительные успехи, что сделало их практически важным инструментом в современном сельском хозяйстве, садоводстве и лесоводстве. Однако сам процесс культивирования растений *in vitro* по сей день остается дорогостоящим из-за высокого процента гибели растений на этапе адаптации к условиям *ex vitro*, а также необходимости использования в составе культуральных сред ингредиентов тонкой химии и органического синтеза. В области сельскохозяйственных биотехнологий требуется в современных условиях импортозамещения, как и во всех других направлениях экономики, разработка новых научно обоснованных подходов. Диссертационная работа Ткаченко Оксаны Викторовны, посвященная разработке и совершенствованию методов культивирования растений *in vitro* с использованием растительно-микробных ассоциаций с ризосферными бактериями, учитывает специфику сегодняшнего дня, а потому представляется особенно важной и своевременной.

Актуальность избранной темы диссертации

Традиционно микроорганизмы в культуре растений *in vitro* рассматривались только в качестве объектов контаминации. Однако с развитием концепции голобионта (растение и его микробиом в единой системе сложных взаимодействий) и омиксных исследований значительное внимание стало уделяться выяснению роли микробиома в жизни растения, изучению механизмов микробно-растительного ассоциативного взаимодействия, оценке роли его отдельных компонентов. Эта развивающаяся область знаний формирует теоретическую базу для биотизации культивируемых в асептических условиях растений и разработки и использования инокулянтов на основе полезных эндофитных и ризосферных микроорганизмов.

Новый подход может помочь снизить материальные и финансовые затраты на производство растений *in vitro* за счет частичной или полной замены некоторых коммерческих синтетических продуктов (фитогормоны, витамины, факторы роста и т.п.), а также повышения эффективности адаптации регенерантов к условиям *ex vitro*. Агробиотехнологии, основанные на создании эффективных микробно-растительных ассоциаций, разрабатываются в разных странах и для многих плодовых, ягодных, декоративных культур, но для важнейших продовольственных культур РФ – пшеницы и картофеля – эти вопросы до сих пор оставались недостаточно проработанными. Мало известно о роли конкретных микробных метаболитов в процессах выращивания растений методом культуры ткани. Это дает основание утверждать, что проблема, сформулированная в диссертационной работе Ткаченко Оксаны Викторовны, является актуальной. По мере углубления научных знаний о характере взаимодействий растений с микроорганизмами, их биотехнологическая реализация может способствовать повышению урожайности, сокращению масштабов использования средств химизации и, в целом, способствовать развитию более устойчивых систем ведения сельского хозяйства.

Структура и основное содержание работы

Диссертация построена по традиционному принципу и состоит из введения, 5 глав, заключения, списков сокращений, терминов и литературы. Текст изложен на 305 страницах основного текста, включает 60 таблиц и 45 рисунков. Список литературы содержит 656 источников, в том числе 549 на иностранных языках. Большинство цитируемых работ выполнено в течение двух последних десятилетий.

Изложение научной работы представляет собой логически обоснованную последовательность решения поставленных в исследовании задач, обладает внутренним единством и отличается высокой степенью детализации и визуализации излагаемого материала.

Во введении автором обоснована актуальность темы исследования, степень разработанности проблемы, корректно сформулированы цель и задачи, теоретическая и практическая значимость выполненной работы, приведены основные выносимые на защиту положения, сведения об апробации.

В первой главе «Управление морфогенезом в культуре соматических тканей растений *in vitro*» проанализированы данные относительно современного состояния метода культуры тканей *in vitro*. Особое внимание уделено рассмотрению способов регуляции морфогенеза с акцентом на том, что биологические агенты крайне редко применяются для повышения эффективности культур растительных клеток и тканей. Сформулированы основные проблемы и перспективы использования ризосферных бактерий и компонентов их клеток для совершенствования агробиотехнологий на основе клеточных и тканевых культур растений.

Во второй главе «Материал, методы и условия проведения исследований» охарактеризованы растительные и микробные объекты исследования, приведены методики культивирования каллусов и клонального микроразмножения растений, изложены методы изучения влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы и на микроклоны картофеля в культурах *in vitro* и *ex vitro*, методы статистической обработки экспериментальных данных. Комплекс использованных в работе аналитических методов (иммунохимии, обратной транскрипции, совмещенной с полимеразной цепной реакцией в реальном времени, светооптической и флуоресцентной микроскопии и др.) адекватен поставленным задачам и позволил получить достоверные результаты и всесторонне проанализировать изучаемые процессы.

В третьей главе «Генетическая модель для изучения влияния морфогенеза в культуре соматических тканей пшеницы *in vitro*» представлены результаты изучения почти изогенных линий мягкой пшеницы, полученных в генотипе сорта Саратовская 29. В процессе работы была создана и апробирована генетическая модель, состоящая из набора почти изогенных линий, альтернативных по генам короткостебельности и отличающихся различной активностью морфогенетических процессов. С использованием предложенной модели разработан новый методический подход для оптимизации метода культивирования каллусных тканей/клеток пшеницы, реализуемый через воздействие на клетки вновь синтезированного вещества – гидротартрат пирролидиния, защищенный патентом РФ. В ходе работы была также выявлена связь между морфогенетическим потенциалом каллусных клеток и содержанием в них белка ПАИ (пролиферативный антиген инициалей). Сделан вывод о том, что ПАИ связан с закладкой меристематических очагов в каллусной ткани пшеницы и может считаться маркером морфогенеза.

В четвертой главе «Изучение влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы *in vitro*» представлена оценка влияния живых и убитых бактерий рода *Azospirillum*, а также компонентов их клеточной стенки – липополисахаридов (ЛПС) с различной химической структурой – на каллусогенез, морфогенетическую активность каллусов и выход растений-регенерантов мягкой пшеницы. Описанные эффекты дополнены анатомо-гистологическими исследованиями зародышей, эксплантированных на каллусогенные среды, и морфометрическим анализом растений-регенерантов. На основе большого объема полученных экспериментальных данных сделано заключение о нецелесообразности применения живых бактерий рода *Azospirillum* для улучшения роста каллусной ткани пшеницы, тогда как ЛПС азоспирилл могут быть использованы в культуре клеток и тканей пшеницы *in vitro* для повышения ее

морфогенного потенциала, и соответственно – для усовершенствования существующих биотехнологических методов.

В пятой главе «Изучение влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на микроклоны картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro*» вопросы бактериальной стимуляции рассматриваются в отношении процесса клонального микроразмножения и адаптации растений к почвенным условиям. Особое внимание автор уделяет изучению ответных реакций растений на инокуляцию азоспириллами, в частности – изменению их гормонального статуса, экспрессии ауксин-зависимых генов и индукции механизмов системной устойчивости. По итогам проведенных экспериментов сделан вывод о том, что при определенных условиях бактериализация мериклонов картофеля значительно повышает качество растений как в условиях *in vitro*, так и *ex vitro* по сравнению с традиционным способом их клонального микроразмножения. Выделены ключевые отличия предлагаемого подхода с применением ризосферных бактерий (PGPR) при клональном микроразмножении растений от существующих. В качестве несомненного преимущества бактериализации отмечена низкая стоимость инокулюма на основе живых клеток бактерий, что не приведет к существенному удорожанию технологии клонального микроразмножения, а с учетом повышения эффективности метода, позволит повысить рентабельность производства оздоровленного посадочного материала картофеля.

В заключении представлены основные выводы диссертационного исследования, показавшего, что биологические факторы могут быть перспективными для развития прикладных агробiotехнологий в селекции и производстве посадочного материала сельскохозяйственных растений. Даны рекомендации относительно использования полученных результатов в современных условиях деятельности российских агробiotехнологических лабораторий и предприятий.

Таким образом, диссертационное исследование характеризуется внутренним единством, логической взаимосвязанностью научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Новизна научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В качестве новых научных результатов диссертантом выдвинуто положение о переходе от гнотобионтного к голобионтному способу культивирования клеток и тканей растений *in vitro*, как более эффективному и экономичному. Показана принципиальная возможность создания микробно-растительных ассоциаций на основе культур изолированных клеток и тканей яровой мягкой пшеницы и картофеля с определенными штаммами бактерий родов *Azospirillum*, *Kocuria* и *Ochrobactrum*. Автором была разработана модель для изучения морфогенетических

процессов в культуре каллусной ткани пшеницы на основе почти изогенных линий, альтернативных по гену короткостебельности и различающихся по эмбриогенной способности. Впервые экспериментально продемонстрировано стимулирующее действие липополисахаридов – структурного компонента клеточных стенок *Azospirillum* – на морфогенетические процессы в каллусной культуре пшеницы и темпы роста мериклонов картофеля. Установлено индуцирующее морфогенез и рострегулирующее действие вновь синтезированного вещества гидротартрат пирролидиния при культивировании каллусной ткани пшеницы. Для повышения эффективности клонального микроразмножения картофеля определены совместимые ассоциативные микропартнеры *in vitro* и подобраны оптимальные условия бактеризации. Определены механизмы воздействия ризосферных бактерий на культуры клеток и тканей пшеницы и картофеля, на адаптацию растений при перенесении в условия *ex vitro*: изменение гормонального статуса, изменение экспрессии их ауксин-зависимых генов и синтез элементов системной устойчивости. В целом, комплекс полученных автором результатов, представляет собой новые научные знания для развития таких областей науки, как биотехнология, физиология растений, микробиология.

Значимость для науки и практики результатов диссертации, возможные конкретные пути их использования

Полученные автором результаты дополняют и расширяют ранее имевшиеся представления о потенциале положительных эффектов воздействия микроорганизмов на растения, раскрывают конкретные механизмы взаимодействия PGPR и их липополисахаридов с клетками растений однодольных и двудольных культур (на примере пшеницы и картофеля). Совокупность новых данных о возможности микробной регуляции процессов каллусогенеза, морфогенеза и регенерации служит теоретической основой к более широкому включению культуры клеток и тканей *in vitro* в современные агrobiотехнологии и селекционные программы, направленные на повышение продуктивности растений, их устойчивость к болезням и стрессам.

Результаты проведенных исследований могут быть использованы в практической работе по клональному микроразмножению оздоровленного посадочного материала картофеля в системе семеноводства, а также в учебном процессе при изучении курсов агрономии, микробиологии и физиологии растений.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность и достоверность защищаемых положений, выводов и рекомендаций, которые содержатся в диссертации, подтверждается внутренней непротиворечивостью результатов и логической целостностью работы, использованием значительного объема экспериментального материала.

Достоверность экспериментальных данных обеспечивается использованием современных средств и методик проведения исследований. Автором изучены и критически анализируются известные достижения и теоретические положения других авторов по вопросам создания растительно-микробных ассоциаций ризосферных бактерий с культурами клеток и тканей растений *in vitro* и возможностью индукции морфогенетических процессов на этой основе. Всего по теме диссертации было проанализировано 656 отечественных и зарубежных литературных источников.

Работы соискателя базируются на основополагающих принципах системного подхода, характеризуются использованием апробированных методов исследования, сертифицированных приборов и статистическим анализом результатов экспериментов.

Автором проведена положительная апробация результатов исследования на международных и всероссийских научных конференциях и в научных публикациях. Всего по теме исследования было опубликовано 96 работ, в том числе 17 статей в ведущих изданиях согласно перечню ВАК Минобрнауки РФ, получен 1 патент РФ на изобретение. Разработаны в соавторстве методические рекомендации «Применение ризосферных бактерий при микроклональном размножении картофеля».

Результаты исследований внедрены в научную и практическую деятельность в ИБФРМ ФИЦ СЦ РАН, ФНБНУ «ФАНЦ Юго-Востока», ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ, а также ИП К(Ф)Х Щеренко П.Ю. и используются в учебном процессе ФГБОУ ВО Вавиловский университет.

Таким образом, можно сделать вывод, что научные положения, выводы и рекомендации, которые содержатся в диссертации Ткаченко О.В., являются в достаточной степени обоснованными и достоверными.

Дискуссионные положения и замечания по диссертации

При общей положительной оценке диссертационного исследования Ткаченко О.В. следует отметить ряд дискуссионных вопросов и замечаний.

1. В работе, к сожалению, не затронут вопрос о возможном влиянии липополисахаридов *Azospirillum* spp. на частоту и спектр возникающих соматоклональных вариаций в каллусной культуре пшеницы. Такая информация могла бы представлять интерес для клеточной селекции и получения растений этой культуры с новыми признаками.
2. Недостаточно подробно изложены моменты, касающиеся выбора культур бактерий для биотизации растений *in vitro*. На основании каких свойств, помимо неспособности утилизировать сахарозу, производился первичный отбор кандидатных штаммов для бактеризации каллуса пшеницы и микрорастений картофеля? Прослеживалось ли влияние источника выделения штаммов, взятых в

исследование, на результат обработки? По какому принципу подбирали пары для ко-инокуляции микрорастений картофеля бактериями различных таксономических групп?

3. При использовании микроорганизмов в технологиях размножения растений *in vitro* некоторые опасные для человека штаммы могут стабильно сохраняться в культивируемых тканях и растениях *ex vitro* (Shiwani, Sharma, Kumar, 2022). В рассматриваемом исследовании не нашел отражения вопрос о безопасности использования в искусственных микробно-растительных ассоциациях бактерий родов *Kocuria* и *Ochrobactrum*, среди которых известны представители, способные вызывать опасные инфекции не только у людей с ослабленным иммунитетом, но и у иммунокомпетентных лиц (Vargas et al., 2026; Siti Rohani, Tzar, 2013).

4. В работе продемонстрирована генотипическая обусловленность реакции картофеля на бактеризацию азоспириллами. Но при этом не рассмотрен вопрос, каким образом различная отзывчивость сортов может сказаться на практическом использовании приема бактеризации в технологиях клонального микроразмножения?

5. Для более убедительной демонстрации преимуществ оптимизированного автором метода микроклонального размножения картофеля с применением ризосферных бактерий желательно представить результаты расчета показателей его экономической эффективности (себестоимость, времязатратность, рентабельность и т.п.) в сравнении с аналогичными показателями базовой технологии, применяемой для получения оздоровленного посадочного материала в системе семеноводства.

Вышеуказанные замечания и вопросы ни в коей мере не снижают научной ценности проведенного исследования и не влияют на общую положительную оценку работы.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней

Изучение диссертации, автореферата и опубликованных автором работ позволяет сделать вывод о том, что исследование проведено соискателем самостоятельно, диссертация написана лично автором, на высоком научном уровне, с использованием современных методов исследований, обладает внутренним единством и содержит новые научные результаты. Защищаемая диссертация является законченным научным трудом, имеющим теоретическое и практическое значение, в котором содержится решение важной задачи современной агробиотехнологии – повышение эффективности методов культивирования клеток и тканей однодольных и двудольных растений *in vitro* посредством создания искусственных растительно-микробных ассоциаций. Внедрение полученных автором результатов по стимуляции микробными липополисахаридами морфогенетических процессов, включая регенерацию в каллусной культуре

зернового злака, и разработанных методических рекомендаций по реализации потенциала представителей ризосферного микробиома в технологиях клонального микроразмножения вносит значительный вклад в развитие сельскохозяйственной науки РФ.

Автореферат соответствует основному содержанию диссертации. Опубликованные работы в достаточной степени отражают содержание и основные результаты, полученные автором диссертации.

По актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов диссертационная работа Ткаченко Оксаны Викторовны «Бактерии рода *Azospirillum* и их липополисахариды как фактор стимулирования морфогенеза пшеницы и картофеля в культуре тканей *in vitro*» соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Ткаченко Оксана Викторовна заслуживает присуждения ученой степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология

Официальный оппонент –

зав. лабораторией биотехнологии растений и микроорганизмов,
главный научный сотрудник ФГБНУ «Федеральный
аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого»,
доктор биологических наук
(03.00.27 – Почвоведение, 03.00.07 – Микробиология),
старший научный сотрудник

 Широких Ирина Геннадьевна

«10» сентября 2026 г.

Подпись И.Г. Широких заверяю

Зам. директора ФГБНУ «Федеральный
аграрный научный центр Северо-Востока
имени Н.В. Рудницкого»



Г.А. Баталова

Место работы: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого»

Адрес места работы: 610007, г. Киров, ул. Ленина, 166а.

Телефон: 8(8332)33-10-39

E-mail: biotekhnologiya@fanc-sv.ru