

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе

ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий»



И.Ф. Шарифуллин, доцент

Шарафуллин И.Ф.

2026 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уфимский университет науки и технологий» на диссертационную работу Ткаченко Оксаны Викторовны на тему «Бактерии рода *Azospirillum* и их липосахариды как фактор стимулирования морфогенеза пшеницы и картофеля в культуре тканей *in vitro*», представленную в диссертационный совет 35.2.035.01 на базе ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук по научной специальности 1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы

Для решения задач продовольственной безопасности и реализации программы импортозамещения в растениеводстве критически важным является обеспечение отрасли высококачественным, генетически однородным и свободным от фитопатогенов посадочным материалом. В связи с этим, особую актуальность имеют вопросы оптимизации биотехнологических методов воспроизводства сельскохозяйственных культур, повышение эффективности культивирования клеток и тканей растений *in vitro*, усиление экологической пластичности растений при переходе от культивирования в пробирке к реальным экологическим условиям. Традиционные этапы микрклонального размножения *in vitro* часто сопровождаются слабым развитием корневой системы и физиологическим стрессом эксплантов. Исследование, выполненное в диссертационной работе О.В. Ткаченко по применению ассоциативных ризосферных бактерий и компонентов их клеточных стенок в качестве биостимуляторов ростовых процессов, является несомненно актуальным, направлено на решение важной научной и практической задачи, открывает новые возможности для направленного регулирования морфогенеза, ускорения роста и повышения адаптивного потенциала растений.

Научная новизна исследований

Еще недавно любое присутствие микроорганизмов в пробирке с клеточной культурой автоматически считалось браком и инфекцией. Проведенное диссертантом исследование «ломает» существующую традицию клеточной биотехнологии, открывая переход от уничтожения микробиома к его проектированию. Автор не просто демонстрирует возможность «управляемой контаминации», а превращает живые бактерии и компоненты их клеток в инструмент управления морфогенезом. Это формирует новое методологическое направление с большим потенциалом развития, обозначенное автором как переход от гнотобиотного к голобионтному культивированию.

Использование автором почти изогенных линий пшеницы, альтернативных по гену Rht-B1c в генотипе сорта Саратовская 29, позволяет различия между сестринскими линиями свести к эффекту одного гена, что резко снижает «шум» генотипической

изменчивости. Двухобъектная модель (высоко- и низкоморфогенный сиб) позволила показать, что стимулирующий эффект липополисахаридов (ЛПС) наиболее выражен именно у слабоморфогенных генотипов, что и составляет практическую ценность подхода для реальной селекции.

Ценным в работе О.В. Ткаченко также является то, что активность ЛПС связывается со строением О-полисахарида: сопоставлены штаммы трех серогрупп с различающимися повторяющимися звеньями, зарядом и размером мицелл; показана неэффективность ЛПС *E. coli* K12 и различия между ЛПС с уоновыми кислотами, фукозой и аminosахарами. Это закладывает основу для направленного подбора/конструирования активных препаратов.

Значимость для науки производства

Важное практическое значение имеют выявленные автором критерии выбора сроков инокуляции в зависимости от способности штамма утилизировать сахарозу среды, подбор консистенции среды, сохранение бактерий и их ростостимулирующей активности на протяжении 5 пассажей после однократной инокуляции, эффект бинарной бактериальной композиции на развитие корневой системы, повышение приживаемости *in vivo* в 1,5 раза, прибавка урожайности мини-клубней картофеля в полевых условиях. Установленные автором механизмы влияния микросимбионтов на гормональный статус культивируемых клеток, экспрессию некоторых генов, синтез отдельных компонентов системной устойчивости имеют важную теоретическую значимость. Они задают методологическую основу для дальнейшего изучения тотипотентности растительной клетки и механизмов переключения векторов её развития под влиянием биотических факторов, что подчеркивает значимость полученных автором диссертации результатов для развития соответствующей отрасли науки.

Рекомендации по использованию полученных автором диссертации результатов

Результаты, полученные автором в ходе исследований, могут быть использованы в научной и практической деятельности, что подтверждается наличием актов внедрения от ИБФРМ ФИЦ СЦ РАН, ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока», ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ, ИП К(Ф)Х Щеренко П.Ю. Кроме того, результаты диссертации используются в учебном процессе ФГБОУ ВО Вавиловский университет.

Степень разработанности темы исследований

Следует положительно отметить выбор объектов исследования и дизайн исследования. В работе используются два модельных объекта разных систематических групп – однодольные (пшеница) и двудольные (картофель), рассматриваются закономерности на двух уровнях организации – каллусных культурах (клетки/ткани) и микрорастениях (органы). Автор приводит полный цикл верификации эффектов: от *in vitro* к *ex vitro* и затем *in vivo*, вплоть до урожайности мини-клубней в поле. Кроме того, анализируется широкий набор штаммов разных таксономических групп.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций

В основных сериях экспериментов выдержаны принцип единственного различия, рандомизация, достаточные объемы выборок (в контроле до 1025 эксплантов), многофакторный дисперсионный анализ с ранжированием по Дункану; идентификация бактерий в ассоциациях проведена иммунохимически со штамм-специфичными антителами (с визуализацией локализации на корнях), что исключает неопределенность, типичную для работ с бактеризацией. Патент (2002), методические рекомендации (2021), четыре акта внедрения и использование в учебном процессе подтверждают завершенность прикладного цикла.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертационная работа О.В. Ткаченко оформлена в соответствии с требованиям ВАК и построена по традиционному плану. Она состоит из Введения, Обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследований (глава 2), трех глав, описывающих результаты экспериментов, Заключение и Выводов. Отдельно выделены разделы Практические предложения и Перспективы дальнейшей разработки темы. Даны также список сокращений и Словарь терминов. Завершают работу Список литературы (656 наименований) и Приложения. Диссертация изложена на 298 страницах, иллюстрирована 45 рисунками и 60 таблицами. В Приложение (6 страниц) включены сведения о Патенте и актах внедрения результатов НИОКР.

Во Введении автор обосновывает актуальность проведения данного исследования, определяет его цель и задачи. Автором выявлена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, указаны основные методы исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, раскрыта степень достоверности и перечислены конференции, на которых проходила апробация результатов, приведены сведения о связи диссертационного исследования с темами приоритетного научного направления университета и грантовой поддержке научными фондами.

Обзор литературы, изложенный на 55 страницах, представляет собой обобщение методологии культивирования соматических тканей и морфогенеза в культуре клеток и тканей *in vitro*, в нем раскрыты химические и физические факторы регуляции морфогенеза в культуре клеток и тканей растений *in vitro*, влияние генотипа донорных растений, самих ризосферных ростстимулирующих бактерий, их полисахаридов и компонентов бактериальных клеток на эффективность морфогенеза. Обзор отличает исторический подход и аналитический характер изложения, опора в основном на классические научные труды. Современные научные статьи, опубликованные за последние 10 лет, составляют 20% от 656 источников литературы.

Глава 2 Материалы и методы исследований описывает используемые в работе генотипы растений, штаммы микроорганизмов, методику изучения влияния бактериальных клеток и их полисахаридов на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы и микроклоны картофеля *in vitro* и *ex vitro*. Для удобства читателя этот раздел можно было бы разбить на параграфы в соответствии с определенными экспериментальными задачами. Описание некоторых методик перенесено в главы 3-5, что усложняет целостное восприятие методического инструментария и критический анализ результатов исследования.

Некоторую методическую информацию хотелось бы выяснить более подробно, в частности: 1) характеристики выровненности растительного материала в разных этапах изучения морфогенеза и размер выборок, особенно при переходе растений-регенерантов картофеля от условий *in vitro* к *ex vitro*, 2) методические особенности экспериментов в полевых условиях, 3) экспериментальная работа охватывает период 2001–2024 гг., как обеспечивалась стандартизация условий (партии сред, ЛПС, субкультуры) при столь длительном периоде исследований? При описании конкретного исследования, длящегося годы, лучше было бы указывать не временной период, а количество серийных экспериментов, 4) хотелось бы больше подробностей об операциях с ЛПС, как их выделяли и как стерилизовали при добавлении в среду (автоклавирование может изменять мицеллы)?

Раздел **Результаты исследования (Глава 3)** начинается с описания генетической модели почти изогенных линий мягкой пшеницы Саратовская 29, альтернативных по генам короткостебельности. Выявлены гены, обладающие различным эффектом на формирование

морфогенных каллусов и сохранение регенерационной способности в процессе пассирования, что может быть использовано для изучения влияния различных факторов на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы. Далее автор приводит информацию о связи между морфогенетическим потенциалом каллусных клеток и содержанием в них белка пролиферативного антигена инициалей (ПАИ) – маркера морфогенеза, а также уравнение, описывающее динамическую модель. Завершает главу анализ эксперимента по выявлению стимулирующих и ингибирующих каллусообразование концентраций производного фурфурола, по химическому строению близкого к группе цитокининов.

Глава 4 посвящена изучению влияния бактериальных клеток и их ЛПС на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы *in vitro*. Сначала автор доказывает, что инокуляция убитыми нагреванием клетками *Azospirillum brasilense* Sp7 могут оказывать стимулирующее влияние на выход морфогенных каллусов и регенерантов в отличие от живых клеток, вызывающих угнетение развития и некроз клеток каллусов. Далее, используя *A. baldaniorum* Sp245, автор исследует влияние введения в среду культивирования каллусов разных концентраций ЛПС этого штамма на каллусогенез короткостебельной и высокорослой линий пшеницы, оценивая содержание белка ПАИ, морфометрические параметры растений-регенерантов. Затем диссертант описывает гистологические характеристики меристематической активности тканей зародышей и морфологическое состояние их структурных компонентов у низкорослой и высокорослой линий пшеницы в недельной динамике в течение трех недель в контрольной группе и под влиянием включения в среду ЛПС *A. baldaniorum* Sp245. Далее следует анализ каллусогенеза, вторичной дифференциации и выхода регенерантов под влиянием введения в среду культивирования ЛПС *A. baldaniorum* Sp245, содержащего О-антиген, и *Escherichia coli* K12, не содержащего О-антиген. Автором экспериментально определена стимулирующая концентрация ЛПС азоспирилл и нейтральное действие ЛПС энтеробактерий на изучаемые процессы, что по мнению диссертанта связано именно с полисахаридной частью молекулы ЛПС. Далее приводится материал по изучению этапов морфогенеза эксплантов и регенерантов высоко- и низкоморфогенных линий пшеницы под влиянием ЛПС разных штаммов и видов азоспирилл, отличающихся по структуре О-полисахаридов и физико-химическим свойствам мицелл. Для изучения характера воздействия ЛПС проанализирована динамика содержания ЛПС в среде культивирования каллуса и изменения в ней пероксидазной активности. Исследовано также влияние препаратов ЛПС ризобактерий других таксономических групп. В результате этой гигантской многоплановой работы определены механизмы влияния бактериальных ЛПС на морфогенетическую активность каллусов и выход растений-регенерантов, а также разработаны рекомендации по оптимизации методики культивирования соматических каллусов пшеницы.

Пятая глава посвящена исследованию бактериальных клеток и их ЛПС на микрорастения картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro*. Сначала автор описывает влияние ризосферных бактерий на микроклоны картофеля *in vitro* в целях повышения их адаптационного потенциала. В сравнительном аспекте исследуется влияние титра бактерий в инокулюме, срока инокуляции на морфометрические параметры и митотическую активность клеток кончиков корней у растений картофеля и хризантемы. Методом иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием специфических к штамму антител изучался характер распределения бактерий на корнях растений, проведен тест на эндифитность. Определена стимулирующая рост микроклонов картофеля плотность клеток

в инокуюме, показано штамм-зависимое и видоспецифичное действие этого фактора на растения, проанализирован рост микрорастений под влиянием замачивания в бактериальной суспензии непосредственно перед высадкой в почву, а также в различные сроки культивирования *in vitro*. Отдельный параграф посвящен оптимизации состава питательной среды на создание и функционирование растительно-микробных ассоциаций при микроклональном размножении. Далее рассматривается сохранность азоспирилл на микроклонах при микроклональном размножении в течение 5 пассажей, по результатам которой выявлена эффективность однократной инокуляции для стимулирования роста и повышения адаптированности микрорастений к условиям *ex vitro*. В следующих параграфах изучены эффективность инокуляции разных генотипов картофеля бактериями *A. baldniorium* Sp245 на рост растений *in vitro* и *ex vitro*, а также ростстимулирующий эффект и адаптогенное действие бинарной инокуляции этого штамма совместно с *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2., с *Kokuria rosea* T1Ks19 и с *Enterobacter cloacae* K7 по сравнению моно-инокуляцией каждым штаммом и контролем. Завершающим разделом экспериментальной работы диссертанта является анализ механизмов влияния азоспирилл на микроклоны картофеля при инокуляции *in vitro*. Автором проанализированы бактериальная продукция индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) *in vitro*, содержание фитогормонов (ИУК, абсцизовой кислоты, цитокининов) в разных органах растений при инокуляции, экспрессия ауксин-зависимых генов и индукция системной устойчивости, оцененная по синтезу каллозы, а также влияние ЛПС на микроклоны картофеля в культуре *in vitro*.

Достоверность полученных автором результатов

Все полученные результаты обсуждены и подкреплены сопоставлением с литературными данными. Достоверность полученных результатов определяется методологией исследования, использованием апробированных классических методов исследования (биотехнологических методов культивирования соматических клеток, тканей и органов растений *in vitro*, классических иммунохимических, физиолого-биохимических, молекулярно-генетических методов), статистическим анализом результатов экспериментов.

Замечания, пожелания и вопросы по диссертации

1. Автор определяет свой подход как «переход от гнотобиотного к голобионтному способу культивирования». Корректно ли применение термина «голобионтный» к системе, включающей всего один-два штамма? Чем предлагаемый подход принципиально отличается от ранее опубликованных работ по бактеризации культур *in vitro* (Visser-Tenyenhuys, 1994; Volkogon et al., 2006; Zaharchenko et al., 2012 и др.), на которые Вы сами ссылаетесь?

2. Гибель каллусов при контакте с живыми азоспириллами объясняется «чрезмерным иммунным ответом». Есть ли прямые доказательства или это остается гипотезой?

3. Почему стимулирующий эффект убитых нагреванием клеток приписан именно ЛПС, если убитые клетки содержат и другие термостабильные компоненты пептидогликан, CpG-ДНК, теиховые кислоты? Тестировали ли Вы эти компоненты по отдельности?

4. Контролировалась ли численность бактерий на поверхности каллусов и в среде? Каким методом подтверждено присутствие «метаболитов фенольной природы»?

5. Убитые клетки повышали выход регенерантов у высокорослого сиба, но снижали у короткостебельной линии. Как Вы объясняете противоположно направленный эффект на один и тот же признак у сестринских линий?

6. Каким образом были получены микроклоны растения картофеля, свободные от нативного микробиома?

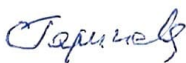
7. Большая величина выпада регенерантов в полевых условиях вызывает краевой эффект. Как автор избежал влияния этого явления при оценке эффективности ростовых процессов и урожайности в опытах?

8. Совместимо ли наличие живых эндофитных бактерий в тканях в течение 5 пассажей с фитосанитарными требованиями к оздоровленному исходному материалу (ГОСТ 33996-2016)? Как будет решаться проблема ложноположительных тестов при бактериологическом контроле в производственных лабораториях?

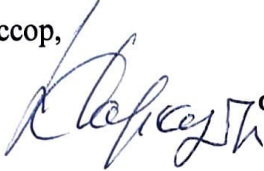
Следует отметить, что высказанные вопросы и замечания носят дискуссионный характер и не снижают общей положительной оценки исследования, выполненного О.В. Ткаченко. Автореферат и опубликованные диссертантом работы отражают основные результаты исследования. Автором опубликованы 96 работ, в том числе 8 в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 9 статей в журналах, индексируемых в международных базах данных WoS и Scopus, 1 патент.

Диссертация Ткаченко Оксаны Викторовны представляет собой самостоятельную научно-квалификационную работу, которая выполнена на высоком научно-теоретическом уровне. Диссертация и автореферат соответствуют паспорту научной специальности 1.5.6. Биотехнология, отвечают требованиям пункта 9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор Ткаченко Оксана Викторовна заслуживает присуждения ученой степени доктора сельскохозяйственных наук по научной специальности 1.5.6. Биотехнология.

Отзыв на диссертацию подготовлен доктором биологических наук, доцентом, профессором кафедры биологии и экологии Уфимского университета науки и технологий Гариповой Светланой Равиловной и доктором биологических наук, профессором, профессором кафедры биологии и экологии Майей Мунирвной Ишмуратовой, обсужден и одобрен на расширенном заседании кафедр биохимии, биотехнологии и физиологии и биологии и экологии (протокол № 2 от 14 сентября 2026 г.).

Доктор биологических наук, доцент,
профессор кафедры биологии и экологии  Гарипова Светлана Равиловна

Доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры биологии и экологии  Ишмуратова Майя Мунирвна

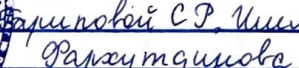
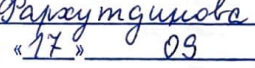
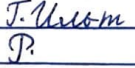
Председательствующий заседания:
Доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой биохимии,
биотехнологии и физиологии  Фархутдинов Рашит Габдулхаевич

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Уфимский университет науки и технологий»

Почтовый адрес: 450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32

Контактный телефон: (347) 229-9616; e-mail: rector@uust.ru



 Гариповой С.Р. Ишмуратовой М.И.,
 Фархутдинова Р.Г.
подпись «17» 09 2026 г.
начальника общего отдела УУНИТ  Нigmatбаева Т. Р.