

ОТЗЫВ

Марковой Юлии Александровны – доктора биологических наук, заведующей лабораторией растительно-микробных взаимодействий СИФИБР СО РАН, официального оппонента на диссертационную работу Ткаченко Оксаны Викторовны «ПРИМЕНЕНИЕ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM* И ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ИХ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК ДЛЯ СТИМУЛИРОВАНИЯ МОРФОГЕНЕЗА ПШЕНИЦЫ И КАРТОФЕЛЯ В КУЛЬТУРЕ СОМАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ *IN VITRO*», представленную на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук по научной специальности

1.5.6 Биотехнология

Актуальность темы.

Использование культуры клеток и тканей растений *in vitro* является основой современной биотехнологии растений. Данные подходы активно применяются для изучения устойчивости растений к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам, в селекции, для оздоровления посадочного материала (особенно культур, размножающихся вегетативно), а также для сохранения генофонда редких видов.

Важнейшую роль в создании и поддержании коллекций культур тканей растений играет поиск оптимальных условий и методов воздействия. Одной из ключевых и сложных задач при работе с культурой соматических клеток и тканей является получение морфогенных каллусов. Это особенно трудно для видов и генотипов, характеризующихся низкой морфогенетической активностью. Для ее повышения традиционно используют различные физические и химические факторы.

Давно известно, что бактерии группы PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) стимулируют рост растений, выделяя необходимые регуляторы роста, такие как ауксины и цитокинины. Эти свойства делают их перспективными для использования в микроразмножении растений. Такой подход потенциально может снизить себестоимость производства растений *in*

vitro за счет частичной или полной замены коммерческих синтетических фитогормонов на микробные аналоги.

Данное направление является новым и активно разрабатывается. Традиционно культура клеток и тканей рассматривалась исключительно как асептическая система, однако в последнее время появляется все больше работ, посвященных использованию в ней микроорганизмов. В то же время прямое взаимодействие живых бактерий с растительными тканями *in vitro* часто приводит к неблагоприятным последствиям из-за отсутствия естественного микробного окружения, ослабленного иммунного ответа изолированных тканей и т.д. Поэтому зачастую вместо живых клеток используют инактивированную культуру, внеклеточные метаболиты или компоненты клеточных стенок бактерий, включая липополисахариды.

Для таких важнейших сельскохозяйственных культур, как пшеница и картофель, поиск подобных биотехнологических подходов представляется важным и своевременным.

В связи с вышеизложенным тема диссертационной работы, посвященной разработке нового подхода к повышению эффективности культуры клеток и тканей *in vitro* на основе использования ассоциативных ризосферных бактерий и компонентов их клеток для стимулирования морфогенеза однодольных (пшеница) и двудольных (картофель) растений на разных уровнях организации, несомненно, является актуальной.

Научная новизна.

Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнений. Автором впервые проведено комплексное исследование, посвященное переходу от гнотобионтного к голобионтному способу культивирования клеток и тканей растений *in vitro*. Показана возможность и определены условия создания растительно-микробных ассоциаций соматических тканей пшеницы и картофеля с ризосферными рост-стимулирующими бактериями рода *Azospirillum* и других таксономических групп.

Существенным элементом новизны является генетическая модель, созданная на основе почти изогенных линий. Автором проведен предварительный скрининг пяти пар почти изогенных линий, альтернативных по генам короткостебельности (*Rht-B1a*, *Rht-B1b*, *Rht-B1c*, *rht14*, *s1*, *Q*), на основе которого отобрана модельная пара сестринских линий, различающихся аллелями гена *Rht-B1c* и *Rht-B1a*. Такой подход выгодно отличает работу от

исследований, где генотипы подбираются без предварительного системного скрининга. Выбор гена Rht-B1c хорошо обоснован литературными и экспериментальными данными. Различия между линиями подтверждены биохимически: каллусные культуры с геном Rht-B1c интенсивнее накапливают пролиферативный антиген инициалей (ПАИ).

Подобраны оптимальные условия инокулирования тканей живыми бактериями, установлено влияние как самих бактерий, так и липополисахаридов их клеточных стенок на морфогенез соматических тканей. К числу наиболее значимых результатов следует отнести данные о механизмах влияния микросимбионтов на гормональный статус культивируемых клеток, экспрессию ряда генов и синтез отдельных компонентов системной устойчивости растений, что существенно расширяет представления о регуляции морфогенетических процессов в культуре клеток и тканей при взаимодействии с ризобактериями.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов исследований.

Теоретическая значимость работы определяется возможностью создания растительно-микробных ассоциаций ризосферных бактерий с культурами клеток и тканей пшеницы мягкой и картофеля *in vitro* и стимулирования на этой основе морфогенетических процессов. Автором определены условия формирования таких ассоциаций, изучены механизмы взаимодействия PGPR и липополисахаридов их клеточных стенок с клетками растений, подобраны оптимальные варианты стимулирования морфогенеза и регенерационной способности соматических каллусов пшеницы, определены ассоциативные микропартнеры для культур соматических тканей картофеля. Практическая значимость подтверждена патентом на изобретение (№ 2186768 от 10.08.2002 г.), методическими рекомендациями по применению ризосферных бактерий при микроклональном размножении картофеля (2021 г.), а также актами внедрения результатов в научную и производственную деятельность ИБФРМ ФИЦ СНЦ РАН, ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока», ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ и ИП К(Ф)Х Щеренко П.Ю. Материалы диссертации используются в учебном процессе ФГБОУ ВО Вавиловский университет по направлению «Агрономия».

Степень обоснованности и достоверность основных научных положений, выводов и рекомендаций, апробация, отражение результатов исследований в публикациях.

Научные положения, сформулированные в диссертации, базируются на достаточном объеме экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов. Проведенные исследования соответствуют поставленной цели и отражают решение всех сформулированных задач. Их достоверность определяется корректной методологией, использованием апробированных методов, сертифицированного оборудования и статистическим анализом экспериментальных данных.

Основные положения и результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на многочисленных научных конференциях различного уровня, включая съезды Общества физиологов растений России, международные конгрессы «Биотехнология: состояние и перспективы развития», конференции «Биология клеток в культуре *in vitro* и биотехнологии» и «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего (PLAMIC)», а также ежегодные конференции Вавиловского университета и другие профильные научные мероприятия.

По теме диссертации опубликовано 96 научных работ, в том числе 8 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 9 статей в журналах, индексируемых в международных базах данных WoS и Scopus, получен 1 патент.

Аннотация диссертации составлена в соответствии с установленными требованиями, ее содержание достаточно полно раскрывает сущность проблемы и отражает основные положения диссертации.

Структура, объем и содержание работы

Представленная диссертационная работа является законченным исследованием, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка терминов, списка литературы и приложения. Список литературы включает 656 источников. Текст изложен на 305 страницах, содержит 45 рисунков, 60 таблиц.

Во Введении (С. 6–17) приведено обоснование актуальности исследования, сформулированы цель и задачи, показана новизна и практическая значимость, представлены основные положения, выносимые на защиту, приводятся сведения об апробации работы, структура диссертации и личный вклад автора, включая сведения о публикациях.

Глава 1 «Обзор литературы» (С. 18–73) состоит из шести разделов, последовательно раскрывающих тему исследования. Автор демонстрирует глубокое понимание предмета, предоставляя систематизированный анализ данных. Автор справедливо отмечает, что рассматриваемые подходы имеют междисциплинарный характер и требуют комплексного изучения на стыке физиологии растений, микробиологии и биотехнологии. Научная ценность обзора высока, он написан хорошим научным языком, логично структурирован и отражает современное состояние проблемы.

Глава 2 «Материалы и методы исследований» (С. 74–86) представляет собой описание экспериментальной части работы и состоит из четырёх разделов. Автор использовал комплекс современных микробиологических, биохимических и молекулярно-генетических методов, соответствующих поставленным задачам. Методическая база исследования достаточна для получения достоверных результатов и их последующей интерпретации.

Глава 3 «Генетическая модель для изучения морфогенеза в культуре соматических тканей пшеницы *in vitro*» (С. 87–98) включает три раздела. В ней представлена генетическая модель на основе почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы, альтернативных по генам короткостебельности. Проведён скрининг пяти пар линий и обоснован выбор модельной пары, различающейся по гену Rht-B1c. Показана связь морфогенетической активности каллусов с накоплением пролиферативного антигена инициалей (ПАИ), а также продемонстрирована возможность использования созданной модели для оценки биологической активности химических соединений.

Глава 4 «Изучение влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на морфогенез в культуре соматических тканей пшеницы *in vitro*» (С. 99–146) включает два основных раздела. В первом разделе изучено влияние живых бактериальных клеток рода *Azospirillum* на каллусогенез пшеницы. Установлено, что живые бактерии вызывают фитоиммунные реакции и некроз каллусной ткани, тогда как убитые нагреванием клетки и их липополисахариды оказывают стимулирующее действие. Во втором разделе

подробно исследовано влияние ЛПС различных штаммов азоспирилл и других ризобактерий на морфогенез, регенерационную способность и содержание ПАИ в каллусах пшеницы. Показана роль О-антигена в стимуляции морфогенеза.

Глава 5 «Изучение влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на микроклоны картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro*» (С. 147–213) включает два основных раздела и представляет собой наиболее объёмную экспериментальную часть работы. В первом разделе исследовано создание растительно-микробных ассоциаций микрорастений картофеля с ризосферными бактериями, подобраны оптимальные условия инокуляции, изучена зависимость эффекта от свойств штамма, состава питательной среды, генотипа растения, а также показана сохранность бактерий при пассировании. Проведены эксперименты по ко-инокуляции несколькими штаммами. Во втором разделе изучено влияние липополисахаридов ризосферных бактерий на микрорастения картофеля в культуре *in vitro*. Отдельный блок посвящён механизмам влияния азоспирилл на микроклоны картофеля: изменению гормонального статуса растений, экспрессии ауксин-зависимых генов и индукции синтеза каллозы.

В Заключение автор обобщает полученные результаты, формулирует основные выводы и намечает перспективы дальнейших исследований. Выводы логично вытекают из содержания работы, соответствуют поставленным задачам и отражают основные научные положения, выносимые на защиту.

Диссертация оформлена в соответствии с установленными требованиями, изложение материала последовательно и логично, иллюстративный материал достаточен для понимания полученных результатов.

Рекомендации по дальнейшему использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Полученные результаты могут быть рекомендованы к дальнейшему использованию в фундаментальных и прикладных исследованиях. В научной сфере перспективно продолжение изучения механизмов действия липополисахаридов ризосферных бактерий на морфогенез, что позволит расширить представления о молекулярных основах растительно-микробного симбиоза. В прикладной области предложенная схема оптимизации микроклонального размножения картофеля с применением ризосферных

бактерий заслуживает внедрения в практику семеноводства оздоровленного посадочного материала, а использование ЛПС в качестве компонента питательных сред может найти применение в клеточной селекции и генной инженерии пшеницы. Разработанные методические рекомендации целесообразно использовать в учебном процессе по направлению «Агрономия» и в системе повышения квалификации специалистов.

Замечания и вопросы

Раздел «Материалы и методы исследований» изложен недостаточно структурированно. Отсутствует общая схема эксперимента, позволяющая проследить логику и последовательность проведения опытов. Заявленная в разделе 2.4 трехкратная повторность не конкретизирована: в одних случаях указаны три повторности внутри эксперимента, в других — остается неясным, идет ли речь о независимых повторностях или технических повторях. Методика выделения и характеристики липополисахаридов изложена лишь ссылочно, без указания степени чистоты препарата.

Название главы 3 «Генетическая модель для изучения влияния морфогенеза в культуре соматических тканей пшеницы *in vitro*» сформулировано некорректно. Морфогенез сам по себе не может выступать фактором влияния, поскольку является процессом. Корректнее было бы говорить о «генетической модели для изучения морфогенеза» или «генетического контроля морфогенеза».

В разделе 3.3 генетическая модель на основе почти изогенных линий, альтернативных по гену *Rht-B1c*, использована для тестирования синтетического цитокининоподобного соединения. Автор ограничился оценкой морфометрических показателей (выход морфогенных каллусов и растений-регенерантов) и не исследовал влияние испытуемого вещества на содержание ПАИ, хотя именно этот маркер был использован в разделах 3.1–3.2 для подтверждения морфогенетической активности отобранной линии. Остается неясным, реализуется ли эффект соединения через те же механизмы, что и эффект гена *Rht-B1c*, или через независимые пути. Исследование динамики ПАИ при обработке каллусов веществом позволило бы логически завершить главу.

В главе 5 при инокуляции микрорастений картофеля используется широкий диапазон концентраций бактериальных суспензий — от 10^4 до 10^8 кл./мл. При этом в разделе 5.1.2 показано, что для картофеля оптимальной

является концентрация 10^4 кл./мл, однако в последующих разделах (5.1.3, 5.1.4, 5.1.6) используются концентрации 10^6 кл./мл без объяснения причин отступления от ранее установленного оптимума. Кроме того, не всегда ясно, приводится ли концентрация в исходной суспензии или в питательной среде после внесения бактерий.

В главе 5 в качестве второго объекта исследования наряду с картофелем используется хризантема сорта Сноубол. На ней получены данные о влиянии азоспирилл на митотическую активность, ростовые параметры и адаптацию к условиям *ex vitro*, причём оптимальные концентрации бактериальных суспензий для хризантемы (10^6 кл./мл) и картофеля (10^4 кл./мл) различаются. Однако хризантема не упоминается ни в задачах диссертации, ни в основных положениях, выносимых на защиту. Возникает вопрос о статусе этого объекта: является ли он равноправной моделью или вспомогательным контролем?

В разделе 5.1.5 для выявления бактерий, ассоциированных с тканями микрорастений, автор использует микробиологический тест с последующей идентификацией выросших колоний методом ИФА. Использование прямого посева из гомогената тканей с подсчётом колониеобразующих единиц (КОЕ) позволило бы оценить степень заселения корней, стеблей и листьев в зависимости от концентрации инокулята, штамма и генотипа растения. Такие данные существенно обогатили бы работу и позволили бы судить о пороговых уровнях колонизации, необходимых для проявления ростостимулирующего эффекта.

Глава 5 представляет собой обширный и разнородный по содержанию раздел, объединяющий как прикладные эксперименты по созданию и оптимизации растительно-микробных ассоциаций, так и фундаментальные исследования механизмов их функционирования. Такая компоновка затрудняет восприятие материала и размывает логику изложения. Представляется, что главу следовало бы разделить на две самостоятельные главы: одну, посвящённую прикладным аспектам (разделы 5.1.1–5.1.7), и вторую, посвящённую механизмам (раздел 5.1.8) и влиянию липополисахаридов (раздел 5.2).

Сделанные замечания не отражаются на общем впечатлении о работе, которая является самостоятельно выполненным научным исследованием. Результаты, полученные соискателем, их анализ и интерпретация не вызывают

сомнений. Выводы соответствуют содержанию работы и достаточно обоснованы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По актуальности избранной темы, степени обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверности и новизне диссертационное исследование Ткаченко Оксаны Викторовны на тему «ПРИМЕНЕНИЕ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM* И ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ИХ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК ДЛЯ СТИМУЛИРОВАНИЯ МОРФОГЕНЕЗА ПШЕНИЦЫ И КАРТОФЕЛЯ В КУЛЬТУРЕ СОМАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ *IN VITRO*», соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», 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:

Маркова Юлия Александровна, доктор биологических наук (03.02.03 - микробиология), заведующая лабораторией растительно-микробных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН)

664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132

Телефон: +7(3952) 42-67-21; Факс: +7 (3952) 51-07-54

e-mail: juliam06@mail.ru

Сайт: <http://www.sifibr.irk.ru/>

Ю. А. Маркова

Подпись Марковой Ю. А. заверяю

Зам.директора СИФИБР СО РАН,

д.б.н., проф:

«14» сентября 2026 г.



Г. Б. Боровский