

ОТЗЫВ

Калашниковой Елены Анатольевны, доктора биологических наук, профессора, ведущего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук» (ИФР РАН), официального оппонента 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 учёной степени доктора сельскохозяйственных наук по научной специальности 1.5.6. Биотехнология (сельскохозяйственные науки)

Актуальность темы.

В биотехнологии растений одним из востребованных и широко применяемых направлений является культура клеток и тканей *in vitro*. Данный метод применяется как ключевой инструмент для фундаментальных исследований, так и для решения прикладных задач в области селекции и семеноводства растений. Учитывая объёмы сельскохозяйственного производства и потребность в стабильных, устойчивых сортах, повышение эффективности биотехнологических методов напрямую влияет на продовольственную безопасность и экономику растениеводства. Потребность в расширении внедрения метода диктуется актуальной проблемой импортозамещения семенного материала и опережающего развития селекции растений.

Несмотря на широкое применение, эффективность технологий *in vitro* остаётся нестабильной и сильно зависит от ряда факторов. Особенно остро проблема стоит для важнейших сельскохозяйственных растений, в том числе для мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), у разных сортов и селекционных линий которой наблюдается низкая способность к эмбриогенезу и органогенезу в культуре *in vitro*. Эффективность клонального микроразмножения вегетативно размножаемых растений, в том числе картофеля, также может быть существенно увеличена за счет повышения адаптационной способности регенерантов к условиям *ex vitro*.

Традиционно культивирование *in vitro* строится на принципах строгой асептики, а контаминация считается проблемой. Однако потенциал использования полезных микроорганизмов (в том числе ризосферных бактерий, RGPB) в условиях *in vitro* практически не изучен, несмотря на доказанную способность таких бактерий стимулировать рост растений в естественных условиях. Исследование механизмов растительно-микробных взаимодействий в контролируемых условиях *in vitro* открывает возможности для создания принципиально новых подходов к повышению эффективности культивирования, стимуляции морфогенеза и улучшению характеристик регенерантов.

Сильной стороной представленной работы является использование в качестве растительных объектов пшеницы и картофеля как представителей двух классов Покрытосемянных растений, а в качестве микробиологических объектов – широко распространенных ризобактерий, в первую очередь рода *Azospirillum*, вступающих в симбиотические отношения с различными видами растений. В изучение включены две основные модели культивирования: клетки и каллусные ткани, а также органы и микрорастения. Кроме живых бактериальных клеток предлагается использовать компоненты клеточных стенок, что повышает технологичность процесса благодаря отсутствию контаминации культуры.

Научная новизна.

Автором разработан способ создания и использования активных растительно-микробных ассоциаций культур клеток и тканей растений *in vitro* с ризосферными рост-

стимулирующими бактериями рода *Azospirillum* и других таксономических групп. В качестве модели для изучения влияния ризобактерий и компонентов их клеточных стенок на процесс морфогенеза в культуре соматических каллусов *in vitro* предложена модельная пара изогенных линий мягкой пшеницы на основе сорта Саратовская 29 и альтернативных по генам короткостебельности (*Rht-B1a* и *Rht-B1c*). Впервые предложена методика инокулирования тканей мягкой пшеницы и картофеля живыми ризосферными бактериями и компонентами их клеточных стенок (липополисахаридов (ЛПС)). Изучены некоторые механизмы влияния ризобактерий на морфогенез клеток и тканей растений *in vitro* (гормональный статус культивируемых клеток, экспрессию ряда генов, синтез отдельных компонентов системной устойчивости).

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

Полученные выводы логично определяются данными экспериментов. Обоснованность выводов определяется большим объемом многолетних исследований и применением методов статистической обработки данных. Предложенные рекомендации могут быть применены в работах по биотехнологии растений. Основные результаты диссертации опубликованы в открытой научной печати в журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также в иностранных журналах с высоким уровнем цитирования. Общее количество публикаций (96 статей), в том числе в рекомендованных изданиях (17 статей), и наличие патента соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов исследований.

Теоретическая значимость работы определяется разработкой нового подхода к голобионтному принципу культивирования клеток и тканей растений *in vitro*. Практическая значимость полученных результатов обеспечивается подбором оптимальных условий и принципов создания растительно-микробных ассоциаций, изложенных в методических рекомендациях «Применение ризосферных бактерий при микроклональном размножении картофеля». Подтверждением практической направленности исследований служат акты внедрения в научную, практическую и педагогическую деятельность в ИБФРМ ФИЦ СНЦ РАН, ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока», ИП К(Ф)Х Щеренко П.Ю., ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ и ФГБОУ ВО Вавиловский университет.

Структура, объем и содержание работы, соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.

Диссертация имеет традиционную структуру, состоит из введения, 5 глав, в том числе обзора литературы, материалов и методов исследований, 3 глав результатов исследований, а также заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка терминов и списка литературы. Общий объем диссертации 305 страниц. В тексте содержится 60 таблиц и 45 рисунков.

Введение соответствует структуре, определяемой ГОСТ на диссертацию.

В первой главе описано современное состояние вопроса культивирования клеток и тканей растений *in vitro* и путей регулирования морфогенеза. На основании анализа литературы обоснована проблема слабой изученности возможности применения ризосферных бактерий для создания растительно-микробных ассоциаций в культуре *in vitro*.

Во второй главе дана характеристика изучаемого материала, в том числе растительных объектов и ризосферных бактерий. Подробно описаны методы проведения исследований.

В третьей главе представлены результаты изучения эффективности культивирования соматических тканей набора почти изогенных линий пшеницы,

альтернативных по ряду генов короткостебельности. Обосновано использование пары сестринских линий, альтернативных по гену Rht-B1c, в качестве модели для изучения способов повышения морфогенетической активности *in vitro*. Эффективность модели подтверждена на примере изучения биологической активности препаратов на основе тетрагидрат(+) гидротартрата(+) цис- [2S, 5R-1,5-диметил-2-(1-окси-3-пропил)] пирролидиния, на что получен Патент на изобретение RU № 2186768.

В четвертой главе описаны эксперименты по совместному культивированию бактерий рода *Azospirillum* и соматических тканей пшеницы *in vitro*, а также изучению влияния липополисахаридов этих бактерий на морфогенез каллусов и регенерацию. Установлена зависимость эффективности ЛПС от штамма бактерий и соответствующих особенностей химического строения молекул.

В пятой главе представлены результаты изучения влияния набора штаммов ризобактерий рода *Azospirillum* и других таксономических групп на микрорастения картофеля *in vitro*. Определены оптимальные условия инокуляции микрорастений ризобактериями. Показана зависимость эффективности рост-стимулирующего эффекта от генотипа как растений, так и бактериальных штаммов. Изучены некоторые механизмы формирования ответных реакций растений на инокуляцию суспензиями бактерий на уровне экспрессии некоторых генов, гормонального ответа и других биохимических реакций.

В разделе «Заключение» подведены итоги проведенных исследований, сделаны выводы, практические предложения и определены перспективы дальнейших направлений исследований.

Список литературы включает 656 источников, в том числе 549 на иностранных языках.

В Приложениях приведены Патент и Акты внедрения результатов исследований в научную, практическую и педагогическую работу.

Автореферат диссертации в целом отражает содержание диссертации.

Рекомендации по дальнейшему использованию результатов и выводов диссертационной работы.

В диссертации имеются рекомендации по практическому использованию результатов для повышения морфогенетической и регенерационной активности каллусов пшеницы путем введения в состав индукционной питательной среды липополисахаридов бактерий *A. baldaniorum* Sp245, а также стимулирования роста микрорастений картофеля и повышения их адаптационной способности путем инокулирования суспензиями чистых культур бактерий рода *Azospirillum* (*A. brasilense* sp7 и *A. baldaniorum* Sp245) или в комбинации с штаммом *Kocuria rosea* T1Ks19.

Замечания и вопросы.

1. В конце Главы 1 «Литературный обзор» необходимо было привести общее заключение по изучаемому вопросу и о целесообразности проведения исследований.

2. В главе 2 «Материалы и методы исследований» желательно указать в каких полевых условиях и на какой площади выращивали донорные растения пшеницы.

3. Необходимо уточнить, каким образом происходила инокуляция микрорастений картофеля.

4. В разделе 3.1 (таблицы 3.1, 3.2, 3.7) приводятся данные по влиянию генов короткостебельности на морфогенез, регенерацию и на выход морфогенных каллусов в культуре пыльников *in vitro* яровой мягкой пшеницы. Однако в Главе 2 ничего не сказано о проведении работ по культивированию изолированных пыльников пшеницы *in vitro*.

5. Следует уточнить, происхождение морфогенных и неморфогенных каллусных культур, в которых был определен ПАИ (раздел 3.2, стр.93).

6. На чем основывается выбор исследуемых концентраций ЛПС?

7. В конце главы 4 целесообразно было бы привести обобщенную таблицу с наилучшими результатами по применению ЛПС различных штаммов *Azospirillum*.

8. В главе 5 «Изучение влияния бактериальных клеток и их липополисахаридов на микроклоны картофеля в культуре *in vitro* и *ex vitro*» приводятся данные не только по картофелю, но и по микроклонам хризантемы. Следует уточнить, почему данный объект присутствует в экспериментальной части, но ничего про него не сказано в Главе 2 «Материал и методы исследований».

9. По тексту встречаются опечатки и неточности в выражениях. Кроме того, автор часто использует такие слова как «вычленились, культивировались, помещались, закладывалось, использовалась, анализировался и др.». Эти действия, которые осуществляются кем то, а не самим объектом. Поэтому целесообразно писать – вычленили, культивировали, помещали и др.

Перечисленные вопросы и замечания не умаляют достоинство и достоверность результатов диссертационной работы и не влияют на ее положительную оценку.

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 «Бактерии рода *Azospirillum* и их липополисахариды как фактор стимулирования морфогенеза пшеницы и картофеля в культуре тканей *in vitro*», соответствует критериям п. 9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемых к докторским диссертациям, а ее автор, Ткаченко Оксана Викторовна, заслуживает присуждения ученой степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Калашникова Елена Анатольевна

доктор биологических наук

научная специальность 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), профессор,

ведущий научный сотрудник Отдела биологии клеток и биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук» (ИФР РАН)

Почтовый адрес организации: 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35

Контактные телефоны: +7 (499) 678-54-00

E-mail: info@ifr.moscow

07.09.2026

Подпись Калашниковой Елены Анатольевны заверяю, ученый секретарь Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН)

Кандидат биологических наук

07.09.2026



Лобус Николай Васильевич