ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Кузнецова Виктора Васильевича на диссертацию Ласточкиной Оксаны Владимировны на тему «Механизмы регуляции устойчивости к абиотическим стрессам эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* Cohn», представленную в диссертационный совет 24.2.479.01, созданный на базе ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий», на соискание ученой степени доктора биологических наук по научной специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений

Актуальность темы исследования

В условиях глобального изменения климата возрастает негативное воздействие различных абиотических стрессоров (засухи, температуры, засоления почв, загрязнения тяжелыми металлами и др.) на рост и развитие растений, что существенно снижает продуктивность сельскохозяйственных культур. Данный процесс усугубляется интенсификацией антропогенного воздействия, обусловленной ростом численности населения. Высокая скорость климатических изменений ограничивает естественный адаптационный потенциал растений, в связи с чем повышение стрессоустойчивости растений является одной из центральных проблем современной биологии. Создать устойчивые к стрессу растения можно разными путями. Прежде всего, путем направленной модификации их геномов. Традиционный подход, основанный на методах классической селекции, характеризуется высокой трудоемкостью и значительными временными затратами. Применение генетической инженерии потенциально позволяет ускорить данный процесс, однако полигенная природа признаков устойчивости в настоящее время ограничивает эффективность этого подхода. Альтернативным направлением является повышение резистентности растений без изменения их генетического аппарата. Перспективным средством выступает использование экологически безопасных регуляторов роста, например, мелатонина, а также применение биопрепаратов на основе рост-стимулирующих бактерий. Настоящее диссертационное исследование посвящено изучению механизмов регуляции устойчивости пшеницы к абиотическим факторам среды при инокуляции эндофитными бактериями *Bacillus subtilis*. Данное направление исследований обладает высокой научной актуальностью и практической значимостью.

Характеристика содержания работы

Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, методической части, семи глав результатов исследования, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Список литературы

ВХОД. № 4355-13
28 10 2025

включает 640 источников. Работа изложена на 347 страницах и включает 60 рисунков и 19 таблиц.

Обзор литературы посвящен комплексному анализу основных аспектов функционирования растительно-микробных систем, включая биосинтез осмопротекторов и антиоксидантов, регуляцию экспрессии наиболее важных генов, роль фитогормонов, биодоступность элементов минерального питания и продуктивность растений. Особое внимание уделено бактериям рода *Bacillus*, оптимизирующим фотосинтетические процессы и повышающим адаптационный потенциал растений. Подчёркнута важность изучения механизмов стресс-индуцированных ответов, таких как редокс-гомеостаз, перестройка гормонального статуса, функционирование фотосинтетического аппарата, и перспективность секвенирования геномов PGP-бактерий для прогнозирования их эффективности их применения в условиях изменения климата. Обзор демонстрирует глубокое знание диссертантом области исследования, что обеспечило корректную постановку задач и интерпретацию результатов.

Глава «Объекты и методы исследований» отражает комплексность работы за счёт широкого набора аналитических методов. Объектом исследования служили растения яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum L.*), представленные двумя экотипами, различающимися по устойчивости к обезвоживанию: лесостепным западносибирским (ЛСЗ: Салават Юлаев, Омская35) и степным волжским (СВ: Экада70, Саратовская55). В качестве основного эндофитного штамма использовали *B. subtilis* 10-4. Исследования включали лабораторные, вегетационные и полевые эксперименты. Методы направлены на оценку морфологических и биохимических параметров, колонизации тканей и устойчивости бактерий к ряду стрессов. Рост растений характеризовали по линейным размерам и массе; редокс-гомеостаз – по уровню МДА, H_2O_2, O_2^-, активности СОД, АРХ, КАТ, содержанию GSH/GSSG и пролина. Фотохимическую активность оценивали флуориметрически, локализацию лигнина и суберина – с помощью световой и конфокальной микроскопии, водный обмен – по интенсивности транспирации, осмотическому потенциалу, относительному содержанию воды (ОСВ) и водоудерживающей способности (ВС).

В первой главе экспериментальной части приведены результаты по молекулярно-генетической идентификации штамма *Bacillus subtilis* 10-4 и дана оценка его биологической активности. Штамм обладает выраженными ростостимулирующими свойствами (PGP-traits) и высокой толерантностью к осмотическому стрессу, засолению, тяжёлым металлам и пестицидам. Он не проявляет фитотоксичности в отношении однодольных и двудольных

растений, а *in vitro* ингибирует ряд фитопатогенов. В условиях *in planta* штамм демонстрирует ростостимулирующий и защитный эффект при воздействии негативных факторов, включая сочетание засухи с фузариозом и гербицидами.

В четвёртой главе изучены реакции на обезвоживание у инокулированных *B. subtilis* растений пшеницы с разными адаптивными стратегиями. Установлено, что *B. subtilis* повышает устойчивость проростков к водному дефициту – максимальный протекторный эффект отмечен у экотипа СВ. Для обоих экотипов наблюдался позитивный эффект на стабильность мембран, содержание хлорофиллов и водный статус листьев. Различия в накоплении пролина свидетельствуют об активации разных метаболических путей в зависимости от генотипа растения. Результаты подчёркивают важность изучения взаимодействия эндофитных бактерий с растениями, имеющими разные стратегии засухоустойчивости.

В пятой главе исследована роль эндогенных фитогормонов (АБК, ИУК, ЦК) в *B. subtilis*-опосредованной устойчивости сортов пшеницы с контрастными адаптивными стратегиями при дефиците влаги. Установлено, что штамм *B. subtilis* 10-4 оказывает дифференцированный защитный эффект на устойчивые (Экада70, Саратовская 55; СВ) и чувствительные (Салават Юлаев, Омская35; ЛСЗ) сорта, что коррелирует с изменением гормонального баланса. Стимуляция роста связана преимущественно с ИУК, а протекторный эффект, наиболее выраженный у сорта Экада70, обусловлен нивелированием стресс-индуцированного гормонального дисбаланса и активацией биосинтеза эндогенной салициловой кислоты (СК). Показана роль эндогенной АБК в регуляции *Bacillus*-индуцированного отложения лигнина и суберина в корнях, что снижает повреждающее действие дефицита влаги. Предполагается возможность индукции системной устойчивости через СК-зависимый сигнальный каскад. Для большей доказательности предложенных механизмов было бы целесообразно подтвердить выводы с применением экзогенных фитогормонов.

Соискатель убедительно показал, что стресс-протекторный эффект эндофитных штаммов *B. subtilis* при водном дефиците связан с их влиянием на фотосинтетический аппарат пшеницы. Он проявляется в предотвращении деградации хлорофиллов и модуляции фотохимической активности ФСII. По мнению автора, эффект обусловлен антиоксидантными свойствами эндофитов, защитой фотосинтетических пигментов, а также оптимизацией работы устьичного аппарата и водопотребления при обезвоживании.

Показано, что защитное действие штамма *B. subtilis* 10-4 при водном дефиците связано с сорт-специфической регуляцией аскорбат-глутатионового (AsA-GSH) цикла.

Экспериментальные данные восьмой главы показывают, что предпосевная инокуляция штаммами *B. subtilis* (10-4, 26Д) оказывает пролонгированное ростостимулирующее и протекторное действие на пшеницу — как в оптимальных условиях, так и при комбинированном стрессе (засуха + гербицид). Штаммы ускоряют восстановление растений в постстрессовый период, улучшая структуру урожая и качество зерна. Выявлено синергическое взаимодействие *B. subtilis* с генетическими программами растений: у устойчивого сорта (Экада70, СВ) усиливается конститутивная адаптация, у чувствительного (Салават Юлаев, ЛСЗ) – активируются компенсаторные реакции. Эти закономерности служат основой для применения биопрепаратов на базе *B. subtilis* для повышения продуктивности пшеницы в условиях комплексных стрессов.

Заключительная глава посвящена полногеномному секвенированию и биоинформатическому анализу генома штамма *B. subtilis* 10-4. Данный раздел имеет важное теоретическое и практическое значение. Автором идентифицированы генные кластеры, отвечающие за колонизацию корней, стимуляцию роста, оптимизацию минерального питания и устойчивость к стрессам. Эти данные создают основу для интеграции штамма в технологии возделывания пшеницы с разными адаптивными стратегиями в условиях абиотических стрессов. При этом сама по себе первичная последовательность генома не раскрывает динамические механизмы взаимодействия бактерии и растения, но служит эффективным инструментом для их дальнейшей расшифровки.

Научная новизна и теоретическая значимость.

Впервые проведено комплексное исследование эффекта эндофитных *B. subtilis* при засухе на гормональный баланс, фотосинтетический аппарат, морфологию устьиц, водный обмен и компоненты клеточной стенки у контрастных по стратегии адаптации сортов пшеницы. Показан протекторный эффект *B. subtilis* на фотохимическую активность ФСII и установлена связь устойчивости к засухе с изменением баланса эндогенных фитогормонов. Впервые продемонстрировано участие ГАМК в повышении устойчивости к комбинированному воздействию гербицида и засухи. Получены приоритетные данные о пролонгированном защитном действии штаммов *B. subtilis* (10-4, 26Д) при комбинированном стрессе и ускоренном восстановлении растений в постстрессовый период. Показано, что универсальные защитные реакции, индуцируемые *B. subtilis* при дефиците влаги, засолении, токсическом действии Cd, сочетании обезвоживания с фузариозом и гербицидной нагрузкой, включают колонизацию тканей, снижение окисления липидов, изменение уровня пролина, лигнификацию

клеточных стенок корней и повышение фотосинтетической активности, что предотвращает снижение урожая. Впервые проведено полногеномное секвенирование и биоинформатический анализ генома *B. subtilis* 10-4; на генетическом уровне охарактеризован его потенциал, определяющий формирование эффективных симбиотических взаимодействий с пшеницей и стимуляцию её роста и продуктивности.

Практическая значимость.

Нет никаких сомнений, что результаты работы значимы для сельского хозяйства: показано, что эндофит *B. subtilis* 10-4 повышает устойчивость пшеницы к засолению, водному дефициту, ионам Cd и комбинированным стрессам (гербицид + засуха, засуха + фузариоз). Защитное действие штамма подтверждено и для других агрокультур – сахарной свёклы, гороха, фасоли и картофеля при различных стрессах. Данные углубляют понимание механизма взаимодействия *B. subtilis* с пшеницей, имеющей разные стратегии адаптации к дефициту влаги, и могут быть основой для создания микробных препаратов для повышения устойчивости растений в условиях меняющегося климата. Полногеномная последовательность штамма *B. subtilis* 10-4 депонирована в международной базе данных – она будет полезна для создания улучшенных штаммов или устойчивых трансгенных растений.

Достоверность результатов исследования

Работа выполнена очень тщательно. Проведено всесторонне изучение влияния двух штаммов *Bacillus spp*. на устойчивость, главным образом, растений пшеницы к абиотическим стрессорам с привлечением большого количества микробиологических, физиологических, биохимических и молекулярных методов анализа. Отдельные положения протестированы на других видах растений. Изучаемые эффекты, такие как засуха, влияние Cd и другие хорошо обоснованы. Все опыты проводили не менее чем в трех биологических и четырех-пяти аналитических повторах. Полногеномное секвенирование *B. subtilis* 10-4 проводили на платформе Illumina, а для биоинформатического анализа генома *B. subtilis* 10-4 использовали современные веб-сервисы.

Основные результаты исследований опубликованы в ведущих российских и зарубежных рецензируемых научных журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных ВАК. Результаты исследований прошли также апробацию на многочисленных международных и Российских конференциях

Наряду с высокой оценкой рассматриваемой работы есть некоторые

вопросы и замечания, которые не ставят под сомнение основные результаты диссертации, и носят, главным образом, уточняющий и рекомендательный характер.

1. В некоторых случаях делается однозначный вывод без достаточного на то основания. Например, изучая накопление лигнина и суберина (рис. 5.1. – 5.3.) в контрольных условиях и при действии ПЭГ, автор заключает, что АБК играет значительную роль в регуляции *Bacillus*-опосредованного ускорения отложения лигнина и суберина в клетках корней пшеницы. Однако в данном разделе АБК не обсуждается. Возможно, есть некоторая корреляция между отложением лигнина и содержанием АБК, но таких данных недостаточно, чтобы прийти к выводу о значительной роли АБК в регуляции данного процесса.

2. Метод определения МДА, широко применяемый в мире, недостаточно специфичен для определения МДА у растений. Этот метод позволяет определить TBARS - thiobarbituric acid reactive substances. Даже применение 1-methyl-2-phenylindole, который повышает специфичность реакции в животных тканях, не изменяет ситуацию в растениях, главным образом, из-за высокого содержания фенолов и углеводов. Рекомендуется метод HPLC для определения содержания МДА в растительных тканях. Во всех других случаях желательно говорить об определении TBARS, а не МДА (Johnston et al. 2007. Plant Physiol. Bioch. 45, 108–112. DOI: 10.1016/j.plaphy.2007.01.011). Замена МДА на TBARS не меняет суть полученных результатов, но делает их интерпретацию более корректной.

3. Не совсем правильно объяснять рост растений увеличением уровня только одного фитогормона (ФГ), например, ИУК. В росте участвует весь комплекс ФГ- ЦК, ГК, АБК и др. Если бы определить содержание не трех, а, например, семи ФГ, то объяснение причины роста, возможно, было бы другим. Кроме того, полученные результаты о роли ФГ были бы более убедительными, если бы попробовать их воспроизвести, применив экзогенные ФГ.

4. Механизм взаимодействия растений и эндофитных бактерий очень сложный. Было бы крайне полезно выяснить пул фитогормонов, синтезируемых как бактериями, так и растением, а также определить какую роль играют бактериальные ФГ на фоне действия ФГ растений. Этот вопрос справедлив и для других метаболитов бактериального происхождения. Наличие в бактериальном геноме генов биосинтеза определенных соединений совсем не означает, что эти бактериальные метаболиты поступят в растение и активно включатся в метаболические пути. Без решения этого вопроса невозможно понять тонкие механизмы взаимодействия бактерий и растений.

5. В диссертации получены очень интересные результаты по влиянию *B. subtilis* на плотность устьиц в листьях молодых растений пшеницы (рис. 6.3). Наблюдается фактически изменение структуры листа. Нет ли хотя бы гипотетического объяснения, за счет чего это может происходить при обработке растений *B. subtilis*.

6. Содержание АБК обычно увеличивается в условиях дефицита воды, что приводит к замедлению роста и способствует повышению устойчивости растений к действующему фактору. Обработка *Bacillus subtilis* 10-4 снижает уровень АБК в условиях водного дефицита и повышает устойчивость растений. Хотелось бы знать, каким образом это может происходить?

7. При анализе генома *B. subtilis* ничего не говорится о генах синтеза АБК, а в заключении делается вывод о синтезе АБК бактериями (вывод 1). Требуется или более детальный анализ генома *B. subtilis* или некоторая коррекция сделанного вывода.

8. И, наконец, два методических замечания.

а) Почему для создания водного дефицита в некоторых опытах использовали не ПЭГ или маннит, а сахарозу? (например, Рис 4.1.).

б) Непонятно почему в работе используется очень высокая концентрация Cd (1 мМ ацетата кадмия).

Диссертация хорошо написана, но есть мелкие замечания (запятые, неудачно использованные слова и др.), которые, по-моему, нет смысла перечислять.

Выводы аргументированы и, в целом, объективно отражают полученные экспериментальные данные. Текст автореферата соответствует результатам и выводам диссертационной работы.

Рассматриваемая диссертационная работа - это завершенный самостоятельный оригинальный научный труд, являющийся цельным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне, в котором на основании проведенных автором исследований разработаны теоретические положения, и даны практические рекомендации, которые можно квалифицировать как научное достижение в области физиологии и биохимии растений: была в значительной степени решена важная проблема повышения засухоустойчивости растений пшеницы к абиотическим стрессам путем применения эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* Cohn.

По актуальности изучаемой проблемы, методическому уровню, степени обоснованности и достоверности полученных результатов, их научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Ласточкиной Оксаны Владимировны на тему «Механизмы регуляции устойчивости к абиотическим стрессам эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* Cohn», представленная на соискание ученой степени доктора

биологических наук по научной специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений соответствует требованиям, установленным пунктами 9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в действующей редакции), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по научной специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент, главный научный сотрудник лаборатории экспрессии генома растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, доктор биологических наук (03.02.12 – Физиология и биохимия растений), профессор

09 октября 2026 года — Кузнецов Виктор Васильевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук
Адрес: 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35,
тел. 8(499) 678-53-44, e-mail: vkusnetsov2001@mail.ru

ПОДПИСЬ
ЗАВЕРЯЮ
ОТД. КАДРОВ

Подпись Кузнецова Виктора Васильевича заверяю

«09» октября 2026 года

Я, Кузнецов Виктор Васильевич, даю согласие на включение своих персональных данных в документы, связанные с защитой диссертации Ласточкиной Оксаны Владимировны и их дальнейшую обработку.

«09» октября 2026 года — Кузнецов Виктор Васильевич