ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Казниной Натальи Мстиславовны на диссертацию Ласточкиной Оксаны Владимировны на тему «Механизмы регуляции устойчивости растений к абиотическим стрессам эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* Cohn», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по научной специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений

Актуальность темы исследований. Несмотря на большое количество исследований в области изучения устойчивости растений к абиотическим факторам внешней среды, полного понимания механизмов ее регуляции на разных уровнях организации все еще не достигнуто. Поэтому вопросы адаптации и стресс-устойчивости сохраняют лидирующие позиции в физиологии и биохимии растений. Взаимодействие растений с микроорганизмами, выявление роли микроорганизмов в повышении устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды, изучены в настоящее время крайне слабо. Вместе с тем известно, что симбиоз растений с микробиотой обеспечивает их лучшее выживание в условиях стресса, а также более высокую продуктивность. Обе эти составляющие чрезвычайно важны в растениеводстве, поскольку обеспечивают высокие урожаи сельскохозяйственной продукции, в том числе в неблагоприятных условиях окружающей среды. Эндофитные бактерии, как известно, индуцируют целый ряд защитных реакции у растений, необходимых при длительных стрессовых воздействиях, что предполагает перспективность их использования в сельскохозяйственном производстве. Однако сведений о воздействии бактериальной инокуляции растений на физиологические процессы у растений, а также на их устойчивость к различным стрессорам, относительно немного, а механизмы, лежащие в основе протекторного действия эндофитных бактерий, изучены фрагментарно. Вследствие этого диссертационная работа О.В. Ласточкиной, направленная на изучение

ВХОД. № 4990-13
«30» 10 2026г.

физиолого-биохимических и молекулярно-генетических механизмов регуляции устойчивости растений к разного рода стрессовым воздействиям при инокуляции их эндофитными бактериями, является весьма актуальной.

Новизна. Представленная диссертационная работа характеризуется высоким уровнем новизны. Автором впервые проведено комплексное изучение влияния эндофитных бактерий *B. subtilis* на целый ряд физиолого-биохимических процессов и показателей у контрастных по стратегии адаптации к засухе сортов пшеницы в условиях дефицита влаги в корнеобитаемой среде. Обнаружены сходства и различия в эндофит-индуцированной реакции растений на данный вид стрессового воздействия. Впервые установлено, что на ранних стадиях развития опосредованная эндофитными бактериями устойчивость растений к водному дефициту связана с поддержанием необходимого баланса фитогормонов, а также с накоплением эндогенной салициловой кислоты. Кроме того, диссертантом получены приоритетные данные, касающиеся пролонгированного защитного действия предпосевной инокуляции *B. subtilis* на рост и биохимические показатели растений пшеницы при одновременном действии двух стрессоров (обработка гербицидом+засуха). При этом растения сформировали высокий урожай зерна высокго качества. Автором впервые проведен полногеномный анализ штамма *B. subtilis* 10-4 и выявлены генетические детерминанты проявления функционально-полезных свойств на уровне фенотипа растений-хозяев в нормальных и стрессовых условиях. На основании полученных данных сделан вывод о формировании эффективного взаимодействия эндофита *B. subtilis* 10-4 с растениями как в оптимальных, так и в стрессовых условиях.

Теоретическая и практическая значимость. Представленная диссертационная работа имеет большую научную и практическую значимость. Полученные автором результаты вносят существенный вклад в понимание фундаментальных основ взаимодействия эндофитных бактерий *B.*

subtilis с растениями. Использование в работе большого числа объектов исследования, а также различных стресс-факторов позволило автору убедительно доказать протекторное действие эндофитных *B. subtilis* в отношении целого ряда физиологических процессов у важных сельскохозяйственных культур, что положительно сказывалось на их продуктивности и устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды. Полученные результаты имеют важное значение для разработки микробных препаратов и интеграции ассоциированных с растениями эндофитных бактерий *B. subtilis* в селекционные программы по созданию более устойчивых к стрессорам сельскохозяйственных культур, а также для внедрения в технологии выращивания культур в разных агроэкологических регионах. Изученный штамм *B. subtilis* 10-4 показал себя как перспективный для практического применения и был депонирован в Национальном биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» (г. Москва), а полногеномная последовательность штамма депонирована в международной базе данных NCBI DDBJ/ENA/GenBank (номер доступа: JAVHKX000000000, геномный проект ID: PRJNA1008864).

Достоверность результатов исследования. Основные положения и выводы, сделанные автором, научно обоснованны и достоверны.Степень обоснованности результатов обусловлена большим количеством изученных видов растений, являющимися важными сельскохозяйственными культурами,большим объемом экспериментальной работы с привлечением разных методических подходов и методов, адекватныхпоставленнойцели исследований. Достоверность полученных данных доказана результатами статистической обработки. Идея работы, а также выдвинутые в ней задачи базируются на обобщении имеющихся в литературе сведений по обсуждаемой проблеме. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на 30 конференциях разного уровня. По материалам диссертации

опубликована 31 работа, в том числе 2 статьи из перечня журналов, рекомендованных ВАК, 9статей из перечня изданий ВАК-МБД, 23 статьи из перечня изданий Web of Science и Scopus, 3 публикации из перечня изданий РИНЦ, 2 главы в монографиях издательства Springer.

Характеристика содержания работы. Структура диссертационной работы О.В. Ласточкиной традиционна. Она состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 347 страницах машинописного текста. В работе представлено 60 рисунков, 19 таблиц. Список литературы включает 640 источников, из них 569 – зарубежных.

Во введении автор доказывает актуальность темы своего исследования, обозначает цель и задачи работы, ее научную новизну, теоретическую и практическую значимость. В этом же разделе представлены положения, выносимые на защиту, апробация работы и список публикаций по теме диссертации, указаны структура и объем диссертационной работы.

Обзор литературы включает 3 подглавы. В обзоре затрагивается проблема устойчивости растений к абиотическим стрессорам, подробно описываются разнообразие и распространение эндофитных бактерий, а также их физиологические функции в растениях. Значительная часть обзора литературы посвящена роли *Bacillus* spp., как типичных представителей эндофитных PGR-бактерий, в устойчивости растений к различным абиотическим стрессорам. Автор останавливается на основных физиологических процессах, таких как рост, фотосинтез, антиоксидантная защита клетки, водный обмен, осмотический стресс у растений. Затрагиваются вопросы, касающиеся известных на сегодняшний день молекулярных механизмов, лежащих в основе микроб-индуцированной устойчивости растений. В отдельной подглаве описываются факторы эффективного взаимодействия растений с PGR-бактериями при стрессовых

воздействиях. Указана также возможность прогнозирования эффективности взаимодействия растений с бактериями в неблагоприятных условиях окружающей среды, где важная роль принадлежит геномному анализу. В завершении обзора литературы, диссертант делает вывод о необходимости исследований механизмов, лежащих в основе действия эндофитных бактерий на растения, что актуально в контексте успешного выращивания сельскохозяйственных культур в неблагоприятных условиях окружающей среды.

В главе «Объекты и методы исследований» перечисляются виды и сорта растений, используемых в работе, указываются штаммы эндофитных бактерий *Bacillus subtilis,* тестовые фитопатогенные микроорганизмы, а также питательные среды. Подробно описана процедура идентификации бактерий, полногеномного секвенирования и анализа физико-химических и ростстимулирующих свойств бактерий. Представлены веб-сервисы, используемые для функциональной аннотации и биоформатического анализа генома *B. subtilis*. Подробно описаны опыты с растениями, проводимые диссертантом в лабораторных, вегетационных и полевых условиях. Указаны также сведения о том, как проводили оценку способности *B. subtilis* колонизировать внутренние ткани растений, а также определяли содержание гормонов, в том числе салициловой кислоты в жидкой культуральной среде бактерий. Представлены методы и методики определения целого ряда физиолого-биохимических и молекулярно-генетических показателей у растений, а также приведены параметры, по которым проводился анализ элементов структуры и качества урожая зерна у пшеницы. В завершении главы указаны биологическая и аналитическая повторности, используемые в опытах, и приведены методы статистической обработки полученных результатов.

Экспериментальная часть работы представлена в семи главах (Главы 3-9).

В главе 3 диссертации представлены результаты проведения молекулярно-генетической идентификации штамма *B. subtilis* 10-4 и

исследований его биологической активности. Автором показано, что данный изолят гомологичен с видами рода *Bacillus,* а данные анализа секвенирования некоторых участков генома и ПЦР-анализа доказывают его идентификацию как *B. subtilis*. Диссертантом построено филогеномное дерево, показывающее положение данного вида бактерий. Проведенная оценка ростстимулирующих свойств штамма обнаружила способность бактерий к синтезу ИУК и сидерофоров, а также к фиксации азота. Поскольку у бактерий механизмы, ответственные за синтез ИУК, изучены крайне слабо, полученные автором сведения о наличии у *B. subtilis* пула генов, связанных с синтезом триптофана, а также генов, включенных в биосинтез ИУК, являются чрезвычайно важными для дальнейших исследований в этой области. На основании полученных результатов диссертант высказывает интересное предположение о наличии у штамма 10-4 триптофан-независимого механизма биосинтеза ИУК, который при снижении активности триптофан-зависимых путей может участвовать в поддержании ее необходимого уровня. Способность же штамма к синтезу ИУК, вероятно, играет определенную роль в успешной колонизации тканей растений. Важным результатом работы, на мой взгляд, является также обнаружение способности *B. subtilis* 10-4 синтезировать сидерофоры, обеспечивающие хелатирование ионов железа (III) и его лучшее усвоение растениями, а также их солюбилизирующая активность в отношении фосфора.

Помимо этого, в работе проведен анализ влияния инокуляции семян пшеницы клетками штамма *B. subtilis* 10-4 на ростовые показатели растений, который выявил положительный эффект бактерий на рост и накопление биомассы корня и побега, а также позволил определить оптимальную концентрацию бактерий для успешного роста проростков данного вида сельскохозяйственной культуры.

Безусловно в растительно-микробных взаимодействиях важным фактором является колонизация бактериями внутренних тканей растения. Вследствие этого результаты наблюдений за ростом бактериальных колоний

с использованием нескольких видов растений убедительно доказывают эндофитность штамма *B. subtilis* 10-4, что отражено на представленных в диссертации и автореферате фотографиях.

Отдельно отмечу опыты по изучению устойчивости клеток *B. subtilis* 10-4 к различным стресс-факторам среды физической (осмотический стресс) и химической (пестициды, избыток кадмия, засоление) природы. Обнаруженная автором способность к росту клеток *B. subtilis* 10-4 в условиях наличия в культивируемой среде таких веществ, как полиэтиленгликоль, гербицид или ацетат кадмия, оказала в дальнейшем выраженный протекторный эффект, снижая их отрицательное влияние на прорастание семян пшеницы после их инокуляции бактериями. Обнаружение генов, кодирующих белки, участвующие в разложении гербицидов, вносят заметный вклад в изучение механизмов повышения устойчивости инокулируемых ими растений к этим стресс-факторам.

Большим плюсом диссертационной работы является изучение устойчивости различных сельскохозяйственных культур к целому ряду стресс-факторов, действующих как отдельно, так и совместно. Результаты этих исследований представлены в подглаве 3.7. Автором обнаружен ростстимулирующий эффект бактериальной инокуляции растений, который проявлялся как на клеточном, так и на организменном уровнях. Описание полученных результатовв диссертации сопровождаются красочными фотографиями, что улучшает восприятие текста. Автором выявлены также некоторые механизмы, обеспечивающие положительное воздействие инокуляции бактериями на растения. В частности, это ускоренное формирование боковых корней, способствующее лучшему поглощению растениями воды и элементов минерального питания; это поддержание необходимого уровня окислительно-восстановительных процессов в клетке, в том числе за счет активизации синтеза пролина; это усиление активности фотосинтетических процессов за счет повышения содержания зеленых пигментов. Важность инокуляции бактериями доказывается и такими

показателями качества получаемой продукции, как увеличение сахаристости клубней сахарной свеклы, повышение урожайности микроклубней картофеля и содержания в них микро- и микроэлементов, а также более высокой устойчивостью сельскохозяйственных культур к стресс-факторам.

В контексте данной работы важным разделом является и изучение лигнификации клеточных стенок растений при инокуляции их бактериями. Автором впервые показано усиление лигнификации клеточных стенок у растений фасоли и пшеницы в условиях избытка соли и кадмия в корнеобитаемой среде при инокуляции их эндофитными бактериями. Важно также отметить, что инокуляция не только приводит к повышению стрессоустойчивости растений, но и увеличивает их урожайность.

Глава 4 посвящена представлению результатов комплексного изучения механизмов устойчивости разных сортов пшеницы, различающихся стратегиями адаптации к водному дефициту, при инокуляции их эндофитными бактериями *B. subtilis*. Автором обнаружено, что бактериальная обработка оказывала более выраженный защитный эффект на сорта степного волжского экотипа по сравнению с сортами лесостепного западно-сибирского экотипа. Обнаруженный эффект объясняется особенностями роста и развития этих растений, что обусловливает разные стратегии их реакции на засуху.

В главе 5 описываются результаты изучения роли гормонов в *B. subtilis*-опосредованном повышении устойчивости растений пшеницы к засухе. Обнаружен ярко выраженный протекторный эффект предпосевной бактериальной инокуляции у растений, что во многом связано со стабилизацией баланса фитогормонов в стрессовых условиях. При этом, автором выявлены различия в гормональном статусе пшеницы из разных экотипов, что, по мнению диссертанта, может определять их разную устойчивость к стрессорам, а также разную чувствительность к инокуляции бактериями. Важно также отметить, что выполненное О.В. Ласточкиной полногеномное секвенирование выявило наличие у *B. subtilis* 10-4 генов,

связанных с синтезом ауксина. Индуцированное *B. subtilis* 10-4 накопление лигнина в клеточных стенках подтвердилось и в этих опытах, что направлено на адаптацию растений к водному дефициту. Обнаруженные диссертантом эффекты важны для разработки стратегий повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к засухе.

Необходимо отметить также важность полученных данных, касающихся роли салициловой кислоты (СК) в *B. subtilis*-опосредованных защитных реакциях пшеницы на стрессовое воздействие. Автором обнаружено повышение уровня эндогенной СК в ответ на бактериальную инокуляцию, скорость которой, тем не менее, различалась у растений из разных экотипов. Оригинально проведенные эксперименты с применением ингибитора биосинтеза СК позволили впервые доказать роль СК как интермедиата при протекторном действии *B. subtilis* 10-4 в отношении растений пшеницы.

Поскольку фотосинтез является одним из наиболее чувствительных к стрессовым воздействиям процессов у растений, выделение в диссертации отдельной главы (глава 6), касающейся изучения влияния инокуляции *B. subtilis* 10-4 на фотосинтетический аппарат пшеницы, вполне оправдано. Автором было высказано предположение, что защитное действие *B. subtilis* 10-4 на рост растений в условиях водного дефицита может быть связано с положительным влиянием на функционирование фотосистемы II, что и подтвердилось в ходе проведенных исследований.

Глава 7 посвящена изучению окислительно-восстановительного баланса у растений пшеницы при инокуляции *B. subtilis* 10-4 и при обезвоживании. Поскольку в стабилизации редокс-статуса клетки важная роль отводится аскорбат-глутатионовому циклу, обсуждение его роли в адаптации растений к водному дефициту при инокуляции бактериями, представляется уместным в контексте представленной работы, учитывая также, что такого рода данных в литературе крайне мало. В ходе этих исследований автором обнаружено, что при инокуляции *B. subtilis* 10-4 активность компонентов антиоксидантной системы растений, в том числе аскорбатпероксидазы и

глутатиона, увеличивается, что способствует повышению их устойчивости к стрессорам. Это является еще одним обнаруженным в ходе работы механизмом повышения устойчивости растений к водному дефициту при их инокуляции эндофитными бактериями. Отмечу также, что и в этом случае ответная реакция растений зависела от сортовой принадлежности пшеницы.

Известно, что в природе неблагоприятные факторы среды, как правило, действуют на растения комплексно. Однако исследований, касающихся совместного действия двух и более стресс-факторов на растения, относительно немного. В этой связи изучение влияния инокуляции эндофитными бактериями на устойчивость растений к одновременному воздействию гербицидов и почвенной засухи (глава 8) представляется важным как с научной точки зрения, так и для практических целей. Кроме того, проведенные в вегетационных и полевых условиях исследования, позволившие получить данные по урожайности и качеству зерна у пшеницы, являются научным обоснованием одного из возможных методов повышения продуктивности этой важной сельскохозяйственной культуры. Автором выявлен пролонгированный положительный эффект предпосевной бактериальной инокуляции на рост растений пшеницы в условиях действия двух стрессоров. Более того, инокулированные растения быстрее восстанавливались после снятия стрессового воздействия. Отмечу также и впервые полученные автором данные о повышении у растений после бактериальной инокуляции содержания эндогенной гамма-аминомасляной кислоты, что считается адаптационным механизмом. С точки зрения практической значимости чрезвычайно важными являются результаты работы, отражающие влияние инокуляции *B. subtilis* 10-4 на урожайность пшеницы в стрессовых условиях. Автором убедительно доказано, что предпосевная бактериальная инокуляция приводила к увеличению урожая зерна и улучшению его качества.

В 9 главе представлены молекулярно-генетические основы обнаруженного в ходе исследований положительного действия *B. subtilis* 10-4

на растения. Показаны результаты полногеномного секвенирования бактерий и представлена кольцевая карта полного генома *B. subtilis* 10-4, выполнен биоинформатический анализ генома. Анализ позволил выявить гены, связанные с ростом растений, минеральным питанием, синтезом гормонов, метаболизмом макроэлементов, а также с их стрессоустойчивостью. Интересным и важным результатом является и обнаруженный факт наличия в геноме *B. subtilis* 10-4 генов устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды, в том числе антибиотикам и тяжелым металлам, что позволяет им успешно устанавливать симбиоз с растением и в неблагоприятных условиях внешней среды. Необходимо также отметить ценность полученных данных, доказывающих способность *B. subtilis* 10-4 подавлять рост фитопатогенных микроорганизмов.

В разделе «Заключение» автор в лаконичной форме подытоживает результаты своих исследований, подчеркивая то, что сделано им впервые. В завершении представлена цепь событий, которая, по мнению автора, приводит к положительному эффекту инокуляции растений *B. subtilis* 10-4, в том числе в случае действия стресс-факторов различной природы.

В целом, текст диссертации и автореферата хорошо структурирован, логика изложения понятна и оправдана, хорошее качество иллюстративного материала позволяет лучше понять и оценить полученные данные.

Вместе с тем к тексту и оформлению диссертации имеются некоторые **вопросы, замечания, комментарии**.

1. Первой задачей диссертационной работы, на мой взгляд, должно было быть изучение ростстимулирующих и физико-химических свойств *B. subtilis*, что и отражено в первом выводе.
2. Учитывая, что у злаков мочковатая корневая система и нет главного корня, лучше говорить о размерах наиболее развитого корня.
3. При проведении разных экспериментов анализировались растения пшеницы разного возраста (5-ти, 6-ти, 7-и, 8-и и 14-ти суточные). Поскольку у злаков первый лист полностью завершает развитие только после появления

шильца 2-го листа, что, как правило, происходит на 7-8-е сут, не повлиял ли на некоторые показатели (особенно связанные с фотосинтезом) тот факт, что лист еще не закончил рост?

4. Согласно ГОСТу 12038-84 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести» энергия прорастания у пшеницы определяется на 3-и сут.

5. Автор пишет, что рецептор гамма-аминомасляной кислоты «ингибирует прохождение аниона через семейство белков, активируемых алюминием малатных транспортеров». (стр. 228 текста диссертации). Не вполне ясна фраза о прохождении аниона через семейство белков.

6. Не ясно, как определяли такие показатели, как «размер проростка» и «длина колоса суммарная».

7. В таблицах 3.6 и 4.2 диссертации не указаны достоверные различия, однако в тексте (стр. 139 и 163, соответственно) сказано, что они имеются.

8. Поскольку выводы должны отражать полученные результаты, можно в них не указывать, что данные получены впервые. Это уже отражено в разделах «Новизна» и «Заключение».

В целом,заданные вопросы носят уточняющий характер, а высказанные замечанияне снижают общего положительного впечатления от диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Ласточкиной Оксаны Владимировны «Механизмы регуляции устойчивости растений к абиотическим стрессам эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* Cohn» является завершенным самостоятельным научным трудом, выполненным на высоком современном методическом уровне, что позволило автору решить важную научную проблему, связанную с выявлением и изучением механизмов регуляции устойчивости растений к абиотическим факторам при инокуляции эндофитными бактериями *Bacillus subtilis*. Следует отметить значительный

объем представленных в диссертации данных, что свидетельствует о большой экспериментальной работе, проделанной автором, несомненным плюсом которой является использование ранообразных современных методов, а также разных объектов исследования. Полученные диссертантом результаты представляют большой научный интерес, имеют ясно прослеживаемую практическую значимость и содержат новые для науки сведения. Диссертация отвечает требованиям ВАК. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Считаю, что диссертационная работа Ласточкиной Оксаны Владимировны на тему «Механизмы регуляции устойчивости растений к абиотическим стрессам эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* Cohn» по своей актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности и обоснованности выводов, апробации основных положений соответствует требованиям пунктов 9-14 Положения «О присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (редакция от 18.07.2026), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Ласточкина Оксана Владимировна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по научной специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической физиологии растений, заместитель директора по научной работе Института биологии – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», доктор биологических наук (03.01.05 – Физиология и биохимия растений)

26.10.2026 Казнина Наталья Мстиславовна

Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук».

Адрес: 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д.11,тел. 8(8142)77-46-82, e-mail: kaznina@krc.karelia.ru

Подпись Казниной Натальи Мстиславовны заверяю.

Заместитель генерального директора
по научно-организационной работе
КарНЦ РАН
д.б.н. _____ Н.В. Ильмаст

Я, Казнина Наталья Мстиславовна, даю согласие на включение своих персональных данных в документы, связанные с защитой диссертации Ласточкиной Оксаны Владимировны, и их дальнейшую обработку.