ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Марковой Юлии Александровны 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 исследования

Растения постоянно подвергаются действию абиотических стрессов, таких как засуха, засоление, экстремальные температуры. Это ведёт к снижению их продуктивности и наносит существенный ущерб сельскому хозяйству. Особую остроту данная проблема приобретает в условиях глобального изменения климата. Пшеница, являющаяся важнейшей продовольственная культура, особенно уязвима к дефициту влаги, так как большая часть её посевов сосредоточена в регионах с недостаточным и нестабильным увлажнением. Поэтому, исследования, связанные с повышением стрессоустойчивости пшеницы, актуальны. Учитывая современный взгляд на растения как на холобионты, функционирующие и эволюционирующие совместно с микроорганизмами, перспективной природной стратегией повышения их стрессоустойчивости является поиск и применение полезных PGPR, например, *Bacillus subtilis*. Несмотря на то, что данное направление активно развивается, механизмы взаимодействия PGPR и PGPE с растениями в стрессовых условиях, особенно комбинированных, изучены недостаточно, а сведения о запускаемых сигнальных путях носят фрагментарный характер. В связи с вышесказанным, исследованные автором роли фитогормонов, антиоксидантного и фотосинтетического аппаратов растений при взаимодействии, а также пролонгированный защитный эффект бактеризации в условиях комбинированного стресса несомненно имеют

ВХОД. № 4388-13
«30» 10 2025 г.

фундаментальное значение. Особую ценность представляет сравнительный анализ контрастных по стратегии адаптации к засухе экотипов мягкой пшеницы. Логическим завершением работы выступает полногеномное секвенирование штамма-эндофита для выявления генетических детерминант его полезных свойств.

Цель диссертационной работы О. В. Ласточкиной сформулирована чётко и логически обоснована. Поставленные задачи характеризуются системным подходом и последовательностью, соответствуют заявленной цели и полностью решены в работе. Для их решения использован комплекс современных физиологических, биохимических, молекулярно-генетических и биоинформатических методов.

Характеристика содержания работы

Диссертация изложена на 347 страницах машинописного текста и состоит из введения, девяти глав, включающих обзор литературы, объекты и методы исследований и семь глав результатов, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа содержит 60 рисунков и 19 таблиц. Список литературы включает 640 источников, из которых 569 — зарубежных.

Во Введении (С. 10–23) 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. 24–88) состоит из трёх разделов, последовательно раскрывающих тему исследования: проблема устойчивости растений к абиотическим стрессам, роль PGP-бактерий, факторы эффективного взаимодействия с растениями. Автор демонстрирует глубокое понимание предмета, предоставляя систематизированный анализ данных. Научная ценность обзора высока, он написан хорошим научным языком, логично структурирован и отражает современное состояние проблемы.

Глава 2 «Объекты и методы исследований» (С. 89–110) представляет собой подробное описание экспериментальной части работы и включает 21 раздел, охватывающие описание объектов исследований, микробиологических, биохимических, молекулярно-генетических и

биоинформатических методов. Методическая база исследования достаточна для получения достоверных результатов и их последующей интерпретации. В качестве объектов исследования автор использует растения яровой пшеницы, гороха, фасоли, редьки масличной, овса, сахарной свёклы. Выбор сортов пшеницы обусловлен их принадлежностью к контрастным экотипам — степному волжскому (СВ: интенсивный рост в начале вегетации и замедленный во второй половине для избегания летней засухи) и лесостепному западносибирскому (ЛСЗС: замедленные темпы всхожести и роста в начале вегетации для избегания весенней засухи и быстрый рост во второй половине). Во всех экспериментах наряду с исследуемым штаммом *B. subtilis* 10-4 автор использует хорошо изученный и активно применяемый штамм 26Д, что позволяет более полно оценить перспективные качества штамма 10-4.

Глава 3 «Идентификация, биологическая активность, ростстимулирующие и антистрессовые свойства *B. subtilis* 10-4 на различные растения» (С. 111–155) посвящена максимально полной характеристике штамма и разбита на семь разделов. В ней подробно описаны морфологические и культуральные свойства *B. subtilis* 10-4, антагонизм по отношению к фитопатогенам *Fusarium* spp., *Alternaria alternata*, *Phytophthora infestans*, фитотоксичность, оценка ростстимулирующих свойств при инокуляции семян разных растений.

Глава 4 «Специфичность ответных реакций инокулированных эндофитными *B. subtilis* растений пшеницы с разными стратегиями адаптации при обезвоживании» (С. 156–166) включает четыре раздела. Она посвящена изучению влияния инокуляции на прорастание семян, накопление пролина, повреждение мембран (МДА, выход электролитов) и водоудерживающую способность листьев у контрастных по стратегии адаптации экотипов пшеницы. Установлено разнонаправленное действие штамма: у устойчивых сортов экотипа СВ бактерия усиливает быстрый рост и обеспечивает почти полную защиту при обезвоживании, тогда как у сортов ЛСЗС она стимулирует накопление биомассы и пролина, приводит к частичной защите мембран и полностью восстанавливает водоудерживающую способность.

Глава 5 «Вклад гормональных перестроек в защитное действие эндофитных *B. subtilis* на различающиеся по стратегии адаптации к засухе растения пшеницы» (С. 167–186) состоит из двух разделов. В ней

раскрываются гормональные механизмы защитного действия. Показано, что ростостимулирующий эффект эндофита обусловлен быстрым накоплением ИУК, а антистрессовый предотвращением ее падения, снижением амплитуды сдвигов АБК и ЦК, а также усилением синтеза лигнина и суберина в корнях. С использованием ингибиторного анализа (АВТ) доказана ключевая роль эндогенной салициловой кислоты в реализации антистрессового эффекта.

Глава 6 «Влияние дефицита влаги и клеток эндофитных *B. subtilis* на состояние фотосинтетического аппарата у растений, различающихся по адаптивным стратегиям сортов пшеницы» (С. 187–196) объединяет три раздела связанные с оценкой пигментного комплекса, фотосистемы II и устьичного аппарата при взаимодействии с эндофитом. Показано, что инокуляция предотвращает деградацию фотосинтетических пигментов, оптимизирует распределение поглощённой световой энергии в ФСII и способствует морфометрической перестройке устьичного аппарата.

Глава 7 «Вклад компонентов AsA-GSH комплекса в вызываемую эндофитными *B. subtilis* стабилизацию редокс-статуса у растений пшеницы с разными стратегиями адаптации при обезвоживании» (С. 197–208) разбита на три раздела. Установлено, что инокуляция снижает содержание H_2O_2 и МДА, а также модулирует компоненты AsA-GSH цикла. Ключевую роль в защите играют аскорбат и глутатион, при этом стратегия защиты зависит от экотипа: у устойчивого сорта — GSH-система, у чувствительного — AsA-система.

Глава 8 «Роль эндофитных *B. subtilis* в пролонгированной устойчивости растений пшеницы при комбинированном воздействии гербицидного прессинга и почвенной засухи» (С. 209–238) включает пять разделов и имеет наиболее выраженное прикладное значение. В ней показано, что предпосевная инокуляция семян *B. subtilis* (10-4 и 26Д) оказывает пролонгированный ростстимулирующий и защитный эффект, сохраняющийся от прорастания до урожая, при комбинированном стрессе. Инокуляция снижает воздействие стресса, ускоряя восстановление растений в пост-стрессовый период. Предотвращает деградацию хлорофиллов, снижает генерацию АФК и накопление МДА, модулирует активность антиоксидантных ферментов и накопление AsA, GSH, пролина. Впервые методом ВЭЖХ выявлено участие эндогенной ГАМК в адаптации растений. Наиболее значимый результат этой главы — повышение урожайности зерна и улучшение его качества. Выявлено, что штамм 10-4 эффективнее действует на сорт Экада70, а 26Д — на Салават

Юлаев. Результаты полевых опытов подтверждают лабораторные данные и свидетельствуют о перспективности применения штамма в экологически ориентированных технологиях возделывания пшеницы.

Глава 9 «Молекулярно-генетические основы физиологического и антистрессового действия эндофита *B. subtilis* 10-4 на растения» (С. 239–266) состоит из двух разделов. В этой главе автор подтверждает результаты физиологических экспериментов с помощью анализа генома *B. subtilis* 10-4.

В Заключении (С. 267–270) автор обобщает полученные результаты 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 качественный и достаточный для понимания.

Научная новизна

Автором впервые проведено комплексное исследование влияния эндофитной бактерии *B. subtilis* 10-4 на гормональный статус, антиоксидантный цикл, состояние фотосинтетического аппарата, водный обмен и компоненты клеточной стенки у контрастных по стратегии адаптации к засухе экотипов пшеницы.

Особым достижением автора является то, что он выявил связь между эффективностью инокуляции *B. subtilis* 10-4 и исходной устойчивостью генотипа растения-хозяина. Так, у сорта (Экада70, СВ экотип) бактерия усиливает уже существующие защитные механизмы: содержание пигментов превышает контроль, гормональный баланс восстанавливается практически полностью, лигнификация и суберинизация выражены сильнее, рост стимулируется максимально. У сорта (Салават Юлаев, ЛСЗС экотип) бактерия компенсирует повреждения, но не создаёт запаса устойчивости: пигменты восстанавливаются лишь до уровня контроля, гормональный баланс нормализуется частично, рост стимулируется слабо. Таким образом, инокуляция даёт более чувствительносу сорту Салават Юлаев шанс на выживание и адаптацию, но не обеспечивает такого же уровня защиты, как у устойчивого. Бактеризация не заменяет селекцию на устойчивость, а

дополняет её: максимальный эффект достигается на генотипах, которые уже обладают высоким адаптивным потенциалом.

Впервые установлено, что в реализации антиоксидантной защиты на ранних этапах онтогенеза ключевую роль играют аскорбат для устойчивого сорта Экада70 и глутатион для чувствительного, тогда как на этапе кущения — глутатионредуктаза для обоих экотипов. Доказан выраженный стресс-протекторный эффект бактеризации на фотохимическую активность фотосистемы II и раскрыта роль эндофитов в предотвращении резких сдвигов в балансе фитогормонов при дефиците влаги.

С использованием ингибиторного анализа впервые показана роль салициловой кислоты как ключевого гормонального интермедиата, а также получены принципиально новые данные об участии эндогенной гамма-аминомасляной кислоты в механизмах адаптации к комбинированному стрессу (гербицид + засуха).

Существенным вкладом в микробиологию и физиологию растений является впервые проведённый биоинформатический анализ полного генома штамма *B. subtilis* 10-4. Автором выявлен и детально охарактеризован уникальный набор генов, детерминирующих процессы колонизации, биоконтроля фитопатогенов, синтеза биологически активных веществ и индукции системной устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессам.

Наконец, впервые выявлено, что предпосевная инокуляция пшеницы *B. subtilis* оказывает пролонгированный ростстимулирующий и защитный эффект, сохраняющийся от прорастания до урожая, при комбинированном стрессе. Установлено улучшение качества продукции: увеличение содержания незаменимых аминокислот, макро- и микроэлементов, улучшение хлебопекарных показателей. Выявлена штамм-специфичность действия: штамм 10-4 эффективнее на устойчивом сорте, штамм 26Д — на чувствительном.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость диссертационного исследования Ласточкиной О.В. определяется углублением фундаментальных представлений о физиолого-биохимических и молекулярных механизмах, лежащих в основе повышения устойчивости растений к абиотическим

стрессам и роли эндофитных бактерий *B. subtilis*. Автором раскрыты сигнальные пути участвующие в этом процессе, гормональная регуляция (ИУК, АБК, ЦК, СК), антиоксидантная система (AsA-GSH цикл), фотосинтетический аппарат, перестройка клеточных стенок. Впервые показано участие эндогенной ГАМК в адаптации растений к комбинированному стрессу. Установленная зависимость эффекта от генотипа растений. У устойчивых сортов инокуляция эндофитами усиливает защиту, а у чувствительных сортов она приводит к компенсации повреждений. Это расширяет наши представления о взаимодействии растений с PGPE и имеет существенное прикладное значение.

Практическая значимость исследования заключается в обосновании эффективности использования эндофитного штамма *Bacillus subtilis* в качестве регулятора роста и биопротектора. Автором определён комплекс универсальных физиологических критериев защитного действия этого микроорганизма, которые можно применять для целого ряда экономически важных культур, таких как пшеница, сахарная свёкла, картофель и зернобобовые, в условиях различных стрессовых воздействий.

Следует особо отметить возможность пролонгированного защитного действия предпосевной инокуляции *Bacillus*, доказанную в главе 8. Автор показал, что инокуляция не только повышает устойчивость растений, но и улучшает качество продукции. Это значимое открытие которое открывает новые перспективы для использования бактеризации в растениеводстве.

Достоверность результатов исследования

Научные положения, сформулированные в диссертации, базируются на достаточном объеме экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов физиологии, биохимии, молекулярной биологии и биоинформатики. Проведённые исследования строго соответствуют поставленной цели и отражают решение всех сформулированных задач. Достоверность полученных результатов определяется корректной методологией, использованием сертифицированного оборудования, комплексным подходом к оценке защитных систем растительного организма и адекватной статистической обработкой экспериментальных данных.

Личный вклад Ласточкиной О.В. является определяющим на всех этапах работы: от формулирования гипотез до проведения экспериментов, интерпретации данных и подготовки основных научных трудов.

Основные положения и результаты диссертационной работы прошли всестороннюю и масштабную апробацию. Они доложены и обсуждены на многочисленных крупных научных съездах, симпозиумах и конференциях всероссийского и международного уровня. По теме диссертации опубликовано достаточное количество научных работ, в полной мере отражающих сущность исследования в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией, в авторитетных журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus.

Автореферат диссертации составлен в соответствии с установленными требованиями, его содержание адекватно отражает структуру и основные положения диссертации.

Замечания, вопросы и комментарии по содержанию и оформлению работы

При общей высокой оценке диссертационного исследования возникли отдельные вопросы и замечания уточняющего характера.

1. Вы моделируете дефицит влаги на проростках, то есть на ранних этапах онтогенеза. Это должно соотвествовать к весенней засухе, к которой эволюционно адаптирован экотип ЛСЗС (Омская35, Салават Юлаев). Почему без инокуляции более устойчивыми оказались сорта СВ экотипа (Экада70, Саратовская55).

2. Защитное действие *B. subtilis* 10-4 в вашей работе основано исключительно на салицилат-зависимом пути. Однако согласно литературным данным эндофитные микроорганизмы активируют жасмонатный путь. Почему вы ограничились только СК-путём и исключили влияние ЖК-пути?

3. Вы показываете, что при 6-суточном стрессе плотность устьиц снижается, а инокуляция это предотвращает. Однако устьица закладываются в молодых листьях и не могут исчезнуть с уже сформированного листа. Какие именно листья вы анализировали — сформировавшиеся до стресса или во время стресса?

5. Раздел, посвящённый устьицам, включён в главу о фотосинтетическом аппарате. Однако устьица — прежде всего регулятор водного баланса, и их логичнее было бы обсуждать в главе 4. Почему вы вынесли устьица в главу 6?

6. В главе 7 сказано, что у сорта Салават Юлаев инокуляция «не предотвращала стресс-индуцированное снижение AsA», но при этом «способствовала поддержанию его уровня на 130–250% выше контрольных значений». Уточните: 130–250% — это относительно нестрессированного контроля или относительно стрессированного варианта без бактерии?

7. Глава 9 содержит избыточно детальный биоинформатический анализ генома *B. subtilis* 10-4, включающий аннотацию подсистем метаболизма аминокислот, нуклеотидов и т.д. Главу следовало бы сократить, сосредоточившись на генетических детерминантах, непосредственно объясняющих результаты глав 4–8.

Отмеченные вопросы не снижают общей высокой оценки диссертационной работы, которая является самостоятельно выполненным научным исследованием. Результаты, полученные соискателем, их анализ и интерпретация не вызывают сомнений.

Заключение

Диссертационная работа Ласточкиной Оксаны Владимировны «Механизмы регуляции устойчивости растений к абиотическим стрессам эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* Cohn» является завершённым самостоятельным научным трудом, который представляет собой цельное исследование, выполненное на высоком методическом уровне, в котором решена важная научная проблема — раскрытие физиолого-биохимических и молекулярно-генетических механизмов повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам под действием эндофитных бактерий *B. subtilis*.

Следует особо отметить комплексный характер исследования, сочетающего физиологические, биохимические, молекулярно-генетические и биоинформатические методы, а также его высокую практическую значимость. Работа отличается широким охватом объектов (пшеница, картофель, сахарная свёкла, горох, фасоль) и стрессоров (засуха, засоление, кадмий, гербициды, комбинированные стрессы), что свидетельствует о фундаментальности и универсальности полученных результатов.

Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.21.

Физиология и биохимия растений. Основные положения работы в полной мере отражены в автореферате и публикациях автора.

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. (в действующей редакции), 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, заведующий лабораторией растительно-микробных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН), доктор биологических наук (03.02.03 Микробиология)

23.10.2026 _____ Маркова Юлия Александровна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук
Адрес: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, д. 132, тел. 8(3952) 42-67-21, e-mail: juliam06@mail.ru

Подпись Марковой Ю.А. заверяю
Уч.секретарь СИФИБР СО РАН,
к.б.н. Т. В. Копытина
«23» октября 2026 г.