

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Ананьева Алексея Александровича «Ассоциированные с *Vitis amurens* Rupr. микроорганизмы, как стимуляторы роста растений», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки)

1. Актуальность темы и общая характеристика работы

Диссертационная работа А.А. Ананьева посвящена поиску, выделению и функциональной характеристике эндофитных бактерий дикорастущего амурского винограда *Vitis amurens* Rupr., обладающих потенциалом стимуляции роста растений (BCPP/PGPR). Тема работы, безусловно, актуальна: снижение зависимости растениеводства от агрохимикатов за счёт использования полезных микроорганизмов является одним из приоритетных направлений современной сельскохозяйственной биотехнологии, а использование дикорастущих, экологически «закалённых» видов растений как источника перспективных штаммов представляется обоснованным и продуктивным подходом. Выбор *V. amurens* в качестве объекта исследования логично аргументирован его уникальной холодо- и патогеноустойчивостью, что создаёт предпосылки для отбора микроорганизмов с широким спектром адаптивных и ростостимулирующих свойств.

Автореферат оформлен в целом в соответствии с требованиями, предъявляемыми к данному виду документов: присутствуют все обязательные разделы (актуальность, степень разработанности темы, цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту, апробация работы, публикации, структура и объём диссертации, выводы, список публикаций). Работа базируется на солидном заделе лаборатории (лаборатория биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН), выполнена при поддержке грантов РНФ и по государственному заданию, что свидетельствует о признании значимости темы на институциональном уровне.

2. Содержание и структура диссертационного исследования

Работа последовательно решает четыре поставленные задачи: (1) скрининг 104 бактериальных изолятов *V. amurens* по признакам мобилизации P, K, S, N и синтеза ИУК; (2) оценка колонизирующей способности отобранных штаммов и их влияния на морфометрию модельного растения *Arabidopsis thaliana*; (3) проверка ростостимулирующего эффекта на сельскохозяйственной культуре *Oryza sativa*; (4) определение генетических детерминант и метаболитов, ответственных за наблюдаемые эффекты, с использованием полногеномного секвенирования и ВЭЖХ-МС. Такая логика построения работы – от первичного скрининга к модельному растению, далее к культуре хозяйственного значения и, наконец, к молекулярно-генетическому и метаболомному подтверждению механизмов – методологически выдержана и соответствует современным стандартам исследований в области PGPR.

Из общего числа изолятов для дальнейшей работы было отобрано 9 штаммов, сочетающих не менее двух ростостимулирующих признаков, обязательно включая синтез ИУК; из них по результатам испытаний на *A. thaliana* и *O. sativa* выделены три наиболее перспективных штамма – *Gordonia aichiensis* P6PL2, *Pseudomonas marginalis* RA62c-B2 и *Pantoea agglomerans* P7SCH-B5, для которых выполнено полногеномное секвенирование, биоинформатический анализ и метаболомное профилирование методом ВЭЖХ-МС высокого разрешения. Комплексность применённых методов (культуральные тесты, метабаркодирование 16S рРНК/ITS1, количественная ПЦР-PB, полногеномное секвенирование на платформах Illumina и Oxford Nanopore, биоинформатический анализ функциональных детерминант, ВЭЖХ-МС) заслуживает высокой оценки и обеспечивает многостороннее обоснование сделанных выводов.

3. Достоинства работы

— Впервые выполнен систематический скрининг ростостимулирующих свойств культивируемых эндофитов *V. amurens* по комплексу из пяти признаков, что существенно дополняет ранее опубликованные данные лаборатории о таксономическом составе микробиома этого вида.

— Показана способность рода *Gordonia* к эффективной колонизации *Arabidopsis thaliana* и, что особенно ценно, впервые продемонстрирована способность бактерии рода *Gordonia* к синтезу цитокининов (транс-зеатина), что является самостоятельным вкладом в фундаментальные представления о метаболическом разнообразии этого рода.

— Результаты подтверждены на двух принципиально разных растительных моделях (двудольное модельное растение и однодольная сельскохозяйственная культура), что повышает достоверность выводов о ростостимулирующем потенциале отобранных штаммов.

— Генетические и биохимические данные (наличие генов биосинтеза фитогормонов и подтверждение продукции ауксинов/цитокининов методом ВЭЖХ-МС) взаимно согласуются и хорошо дополняют друг друга, придавая работе завершённый, методологически цельный характер.

— Результаты работы апробированы на четырёх научных конференциях и опубликованы в 10 работах, включая 3 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в международных базах цитирования, что свидетельствует о признании результатов научным сообществом.

4. Замечания по содержанию и оформлению

Наряду с несомненными достоинствами работы, необходимо отметить ряд замечаний, часть из которых носит принципиальный характер.

— Способность к «фиксации азота», выявленная на среде Эшби у 39 изолятов (в т.ч. у всех трёх приоритетных штаммов), в дальнейшем не подтверждается на генетическом уровне: как указывает сам автор, полный *nif*-оперон не обнаружен ни в одном из трёх секвенированных геномов. Автор постулирует «альтернативные механизмы ассимиляции азота», однако это остаётся гипотезой, не подкреплённой прямыми экспериментальными данными (например, анализом экспрессии соответствующих генов или изотопным методом $^{15}\text{N}_2$). Формулировка вывода 1, где «фиксация N» указана как один из ростостимулирующих признаков подтверждённых штаммов, в этом контексте выглядит недостаточно строгой.

— Среди штаммов, выбранных для дальнейшего изучения, присутствуют представители родов, включающих клинически и фитопатологически значимые виды (*Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, а также вид *Pseudomonas marginalis*, известный, в том числе, как возбудитель мягкой гнили и некроза сердцевины ряда овощных культур). В автореферате отсутствуют данные о целенаправленной проверке отсутствия у изучаемых изолятов фитопатогенных детерминант, что представляется существенным упущением с точки зрения обоснования безопасности штаммов как основы будущих биопрепаратов.

— В работе отмечается разнонаправленный эффект инокуляции на *A. thaliana*: угнетение роста гипокотыля и корня на 7-е сутки сменяется стимуляцией биомассы к 30-м суткам лишь у двух из семи колонизировавших растение штаммов. Причины столь выраженной разнонаправленности (стрессовая реакция на бактериальную нагрузку, ингибирующий эффект избытка ИУК) обсуждаются на уровне общих предположений, без прямой экспериментальной проверки (например, без определения фактической концентрации ИУК в ризосфере/тканях на разных сроках).

— Количественная оценка фитогормонов методом ВЭЖХ-МС носит качественный, а не количественный характер (идентификация по соответствию эталонным масс-спектрам без определения концентраций), что ограничивает возможность содержательного сопоставления продуктивности штаммов между собой и с литературными данными.

— В тексте встречаются отдельные терминологические и опечаточные неточности (например, «ахреи» вместо «археи», «техническими проворностями» вместо, по-видимому, «техническими повторностями», расхождение в номере штамма референса «RA62с-B5» в таблице 1 и тексте раздела «Результаты»), которые следует устранить при подготовке окончательного текста диссертации.

— Не вполне ясна логика статистической обработки для части экспериментов: в подписях к рисункам фигурируют одновременно «независимые эксперименты» и «технические повторности» в весьма больших количествах (например, 10 независимых экспериментов с 20 техническими повторностями), но в разделе «Материалы и методы» единый регламент числа биологических и технических повторностей не приведён, что затрудняет оценку статистической мощности представленных сравнений.

5. Вопросы к автору

В порядке дискуссии и для более полного раскрытия содержания работы прошу автора ответить на следующие вопросы.

1. Проводилась ли и планируется ли в дальнейшем проверка отсутствия фитопатогенного потенциала у штаммов, относящихся к родам с известными патогенными представителями – например, тест на образование опухолей на модельных растениях, ПЦР-скрининг генов вирулентности или Ti-плазмиды,

оценка пектолитической активности? Насколько это необходимо, на взгляд автора, для дальнейшего продвижения данных штаммов в качестве кандидатов для биопрепаратов?

2. Чем, по мнению автора, объясняется отсутствие полного *pif*-оперона в геномах штаммов *Gordonia aichiensis* P6PL2, *Pseudomonas marginalis* RA62c-B2 и *Pantoea agglomerans* P7SCH-B5 при их положительном росте на безазотной среде Эшби, и какие эксперименты позволили бы однозначно подтвердить или опровергнуть гипотезу об «альтернативных механизмах ассимиляции азота» (в частности, о роли нитрат-/нитритредуктаз)?

3. Чем объясняется разнонаправленный характер влияния одних и тех же штаммов на морфометрические показатели *Arabidopsis thaliana* на разных сроках развития (угнетение роста гипокотилия и корня 7-дневных проростков против стимуляции биомассы 30-дневных розеток), и проводилось ли прямое определение содержания ИУК и/или экспрессии генов, связанных с ауксиновым сигналингом, в тканях растений на этих сроках, чтобы разграничить гипотезы о стрессовой реакции на бактериальную нагрузку и об ингибирующем избытке ауксина?

4. Планируется ли количественное (а не только качественное) определение содержания идентифицированных фитогормонов (ИУК, транс-зеатина, N⁶-изопентениладенина) в культуральных экстрактах штаммов *G. aichiensis* P6PL2, *P. marginalis* RA62c-B2 и *P. agglomerans* P7SCH-B5, а также оценка их стабильности и продуктивности синтеза во времени, что важно для перехода от лабораторного скрининга к технологии производства биопрепарата?

Отмеченные замечания носят преимущественно частный характер и не снижают общей высокой оценки работы. Диссертационное исследование А.А. Ананьева выполнено на современном методическом уровне, характеризуется логичной структурой, обоснованностью выводов и практической направленностью результатов. Работа содержит элементы научной новизны (в частности, первое описание способности рода *Gordonia* к синтезу цитокининов, полногеномная характеристика трёх новых для *V. amurensis* штаммов-продуцентов), имеет теоретическое и прикладное значение для развития технологий биопрепаратов на основе PGPR-микроорганизмов.

Считаю, что диссертационная работа «Ассоциированные с *Vitis amurensis* Rupr. микроорганизмы, как стимуляторы роста растений» соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки), а её автор, Ананьев Алексей Александрович, заслуживает присуждения искомой учёной степени.

доктор биологических наук (1.5.14 – Энтомология),
Ведущий научный сотрудник лаборатории
селекционно-генетических исследований полевых
культур ФГБНУ «ФНЦ агробιοтехнологий
Дальнего Востока им. А.К. Чайки»
692539, Россия, Приморский край, г. Уссурийск,
пос. Тимирязевский, ул. Воложенина, 30
mnathalie134@gmail.com

Мацишина Наталия Валериевна

Подпись Мацишиной Н.В. заверяю
учёный секретарь ФГБНУ «ФНЦ
агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А.К.
Чайки», канд.с.-х.наук

Инишкова Светлана Николаевна

28.08.2026 г.

Даю разрешение на размещение данного отзыва в
открытом доступе

Мацишина Н.В.
28.08.2026 г.