

ВІДГУК
офіційного опонента на дисертаційну роботу
Шаховніної Олени Олександрівни
«АСОЦІАТИВНА АЗОТФІКСАЦІЯ І ДІАЗОТРОФИ КОРЕНЕВОЇ
ЗОНИ ПШЕНИЦІ ЯРОЇ ТА ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО»,
представленої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія
до спеціалізованої вченої ради К79.377.01 в Інституті
сільськогосподарської мікробіології та агропромислового
виробництва НААН України

Актуальність обраної теми

Сучасне землеробство все більшу увагу приділяє застосуванню екологічно безпечних технологій вирощування сільськогосподарських культур. Використання потенціалу асоціативних азотфіксувальних систем мікроорганізмів з рослинами є одним з найбільш поширених екологічно безпечних заходів у технологіях вирощування сільськогосподарських культур, у тому числі зернових. Проте ефект від застосування біопрепаратів на основі асоціативних діазотрофів дуже варіабельний і залежить від багатьох факторів. Відмічається, що навіть за однакових метеорологічних умов і агротехніки результати інокуляції різняться у рослин різних сортів. Зважаючи на те, що на ринку існує багато сортів зернових культур недостатньо вивченим є питання про сортову і внутрішньосортову мінливість рослин за здатністю сприяти формуванню і функціонуванню асоціативних азотфіксуючих систем мікроорганізмів. Саме тому актуальною є дисертаційна робота Олени Олександрівни Шаховніної, яка присвячена дослідженню азотфіксувального потенціалу і шляхів підвищення ефективності асоціативних систем азоспирил з рослинами ярої пшениці і ярого тритикале різних сортів. З іншого боку, для роботи у даному напрямку вкрай необхідними є розробка шляхів підвищення ефективності функціонування асоціативних азотфіксуючих систем "діазотроф-рослина", що також є предметом досліджень автора дисертації.

Актуальність дисертаційної роботи також підтверджується тим, що вона виконана відповідно до планів відомчих фундаментальних програм Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААНУ

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень дисертації

Автор поставив собі за мету дослідити азотфіксувальний потенціал асоціативних систем діазотрофних мікроорганізмів з рослинами ярих пшениці і

тритикале різних сортів та розробити шляхи його підвищення. Відповідно до поставленої мети розв'язано 7 основних завдань.

Усі експериментальні результати, наукові положення і висновки роботи побудовані на матеріалах власних досліджень. Їх достовірність визначається достатньою кількістю експериментальних досліджень, застосуванням для вирішення поставлених задач сучасних мікробіологічних, молекулярно-біологічних, біохімічних і фізіологічних методів. Достовірність отриманих результатів підтверджено статистичною обробкою отриманих результатів.

Наукові положення, висновки та рекомендації обговорені науковою спільнотою на вітчизняних та міжнародних конференціях.

Наукова новизна

На основі результатів проведених досліджень отримано і науково обґрунтовано нові теоретичні і експериментальні положення щодо існування вірогідної міжсорткової і внутрішньосорткової мінливості сортів ярих пшениці і тритикале за здатністю формувати і підтримувати асоціативну азотфіксувальну систему з діазотрофами кореневої зони.

Виділені нові штами асоціативних діазотрофів, визначено їхні морфологічні, фізіологічні, молекулярно-біологічні характеристики і вплив на рослини. Вперше сиквеновано та проаналізовано нуклеотидні послідовності гену 16S рРНК селекціонованого штаму *A.brasilense*10/1.

Новизна отриманих даних підтверджена патентами на новий спосіб оцінки асоціативної азотфіксувальної системи "діазотрофні мікроорганізми-рослина" (Патент України №63718), і нові штами азоспірил (Патенти України №104212 і №105118).

Практичне значення одержаних результатів

Наукові здобутки дисертанта мають не тільки фундаментальне, а й безперечне прикладне значення. Виділений автором штам *A.brasilense*10/1 на підставі результатів випробування його ефективності може бути рекомендований як біоагент мікробного препарату при вирощування тритикале ярого. Виробництву рекомендовано технологію вирощування цієї культури, що дає можливість підвищити її продуктивність і покращити якість отриманої продукції. Ефективність рекомендацій підтверджено актами випробування у виробничих умовах.

Оцінка змісту та завершеності дисертації

Дисертація О.О.Шаховніної подана за традиційною схемою, українською мовою на 169 сторінках комп'ютерного тексту (120 сторінок основного змісту), ілюстрована 19 рисунками, 41 таблицею, 5 додатками; складається зі вступу, огляду літератури, об'єктів і методів досліджень, 5 розділів результатів

досліджень, рекомендацій виробництву, висновків, списку літературних джерел (містить 236 найменувань, у тому числі 116 – зарубіжних авторів) та 5 додатків.

У вступі окреслено актуальність роботи і доцільність дисертаційного дослідження. Чітко сформульовані мета роботи, об'єкт та предмет дослідження, що корелюють з назвою роботи та сформовано відповідні меті задачі.

Огляд літератури складається з двох підрозділів і містить інформацію про сучасний стан вивчення рослинно-мікробних взаємодій в системі "злакова рослина-діазотрофи", а також про асоціативні бактерії роду *Azospirillum* та їхні функції у рослинно-мікробній системі. Автор звертає увагу на те, що процес асоціативної азотфіксації пов'язаний з генетичним контролем з боку рослини. Підкреслюється неоднозначність даних щодо здатності рослин успадковувати підвищений рівень нітрогеназної активності мікробно-рослинної системи.

У другому підрозділі описані діазотрофні бактерії роду *Azospirillum*, їхні фізіологічні особливості, а також позитивні ефекти дії на рослини. Ця частина огляду літератури свідчить про досконале вивчення питань, які стосуються обраної області досліджень, але вона дещо забагато розширена і містить посилання, які безпосередньо не стосуються теми дисертаційної роботи, наприклад, історія вивчення азоспірил, особливості їх класифікації. Загальний обсяг огляду літератури не перевищує рекомендованого по відношенню до основної частини дисертації.

У розділі 2 описано об'єкти і методи досліджень Пошукачем було застосовано відповідні для вирішення завдань сучасні і класичні мікробіологічні, біохімічні, молекулярно-біологічні, фізіологічні і польові методи. Схеми дослідів і повторність в експериментах достатні для статистичного опрацювання отриманих результатів. У роботі використано перспективні 7 сортів пшениці ярої і 7 – тритикале ярого.

У розділі 3 подані результати дослідження асоціативної азотфіксувальної системи діазотрофів роду *Azospirillum* з рослинами ярих пшениці і тритикале різних сортів. О.О.Шаховніною отримані пріоритетні дані щодо існування мінливості активності рослинно-мікробної азотфіксувальної системи, як міжсорткової (яка сягає 40-47%), так і внутрішньосорткової (31-83%); остання навіть іноді перевищує мінливість у різних сортів.

Виявлено залежність потенційної активності азотфіксації з метеорологічними показниками – температурою повітря і ґрунту та кількістю опадів.

Встановлено, що такі поширені селекційні ознаки рослин як висота, довжина колосу, маса і кількість зерен у колосі не можуть бути використані для виявлення тих сортів, які утворюють активні азотофіксувальні мікробно-рослинні системи. Тобто селекційна робота потребує тісної взаємодії з

мікробіологами. Для здійснення такої взаємодії О.О.Шаховніна розробила спосіб оцінки азотофіксувального потенціалу мікробно-рослинних систем у різних сортів зернових культур (Патент України №63718).

Розділ 4 містить експериментальні дані щодо скринінгу діазотрофів за їх здатністю утворювати ефективні азотофіксувальні мікробно-рослинні системи. Для цього було проведено дослідження складу діазотрофних мікробних угруповань у кореневій зоні пшениці ярої і тритикале ярого, виявлено представників азотфіксувальних бактерій - азотобактеру, флуоресціюючих псевдомонад, анаеробних клостридальних бацил, олігоазотрофних і факультативно симбіотрофних азотфіксаторів. На підставі дослідження азотфіксувальної здатності було виділено активні ізоляти, серед яких найбільшою активністю характеризувались представники роду *Azospirillum*. Порівняльні дослідження нововиділених і колекційних культур за нітрогеназною активністю як у чистій культурі, так і в асоціації з рослиною дали можливість виділити найбільш активні з них, зокрема, *Azospirillum* sp 77 і 10/1. До того ж відібрані ізоляти продемонстрували здатність стимулювати ріст корінців.

На наступних етапах досліджень автор зосередила увагу на визначенні таксономічного положення ізолятів, найбільш перспективних для утворення асоціативної системи з тритикале і пшеницею. За морфологічними, фізіолого-біохімічними характеристиками, а також за результатами сиквенс-аналізу фрагменту гену 16S рРНК ізоляти було ідентифіковано як *Azospirillum brasilense* під колекційними номерами 10/1 і 77. Довжина ампліфіковано фрагменту (1206-1362 п.н.) і ідентичність послідовностей є достатніми для визначення виду штаму.

Безсумнівним позитивним аспектом дисертаційної роботи є комплексі дослідження впливу нововиділених перспективних штамів на рослини – потенційну нітрогеназну активність і біосинтетичні процеси. Зокрема, доведено, що за інокуляції насіння ярих пшениці і тритикале в рослинах підвищувалась глютамінсинтезна активність – фермент, який залучений у шляхах асиміляції азоту і синтезі білка. Відповідно в рослинах зростав вміст розчинного білка, що позитивно позначилось на накопиченні біомаси.

У розділі 5 проведено оцінку впливу бактеризації штамом *A.brasilense* 10/1 насіння тритикале ярого на активність асоціативної азотфіксувальної системи. Для характеристики варіацій нітрогеназної активності автор використала багато статистичних показників. Аналіз отриманих розрахунків дозволив зробити цікаві висновки стосовно того, що застосування селекціонованого штаму *A.brasilense* 10/1 не тільки підвищує потенційну нітрогеназну активність (у 3,2-4.7 рази), але й знижує внутрішньосортову

варіабельність. Це дає можливість реалізації потенціалу сільськогосподарської культури.

У наступному **розділі 6** наведено результати випробувань ефективності застосування *A.brasilense* 10/1 для підвищення урожайності та якості отриманої продукції. Встановлено, що позитивний вплив на рослини зумовлений підвищенням нітрогеназної активності асоціативної системи, а також рістстимулювальною активністю метаболітів цього штаму. Результати багаторічних польових дослідів, проведених на трьох сортах тритикале, засвідчили, що використання цього штаму як інокулянта забезпечувало вірогідний приріст урожаю (на 16,4%), покращувало його структуру і якість, зокрема у зерні підвищувались вміст білка і сирої клейковини, натурна маса зерна.

У **розділі 7** доведено, що бактеризація насіння штамом *A.brasilense*10/1 є економічно і енергетично вигідним елементом агротехнології вирощування тритикале, що сприяє зниженню собівартості, збільшенню прибутку та підвищенню рівня рентабельності.

Отримані дані дали можливість дисертанту науково обґрунтувати і практично довести, що новий штам *A.brasilense* 10/1 можна рекомендувати для створення ефективного біологічного препарату для інокуляції насіння тритикале ярого. Для реалізації застосування нового препарату розроблені **рекомендації виробництву**, де викладена технологія вирощування тритикале ярого.

Кожний з розділів дисертації має сформульовані висновки та наукові положення зі стислим викладенням наведених у розділі наукових і практичних результатів.

Виходячи з аналізу основної частини дисертації, можна стверджувати, що мета дисертаційної роботи в ході досліджень була досягнута, а дисертація є завершеною науковою кваліфікаційною працею.

Висновки дисертації аргументовані, сформульовані логічно і відповідають змісту роботи.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях

Основний зміст дисертаційної роботи викладено у 17 працях, з яких 5 статей у фахових наукових журналах, 3 патенти України, 2 - рекомендації виробництву, 7 - тези доповідей конференцій та статті в інших виданнях. Публікації за темою дисертації повністю відображають основні положення та результати роботи.

Відповідність змісту автореферату основним положенням дисертації

За структурою, змістом та оформленням автореферат відповідає вимогам МОН України. Зміст автореферату та основні положення дисертації є ідентичними.

Дискусійні положення та зауваження

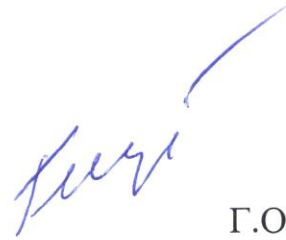
При детальному аналізі дисертаційної роботи О.О.Шаховніної виникло декілька зауважень та запитань, на які бажано отримати відповідь автора.

1. У розділі 2 "Об'єкти і методи досліджень" не наведено посилань на розрахунки таких показників як медіана, модальний інтервал, коефіцієнти асиметрії та ексцесу.
2. Методику, яка є основою способу оцінки азотофіксувального потенціалу мікробно-рослинних систем у різних сортів зернових культур (Патент України №63718) краще викласти у розділі 2 "Об'єкти і методи досліджень", а результати застосування цього способу - у розділі 3
3. Чому у розділі 3 для визначення мінливості за нітрогеназною активністю досліджено по 7 сортів ярих пшениці і тритикале, а у наступному розділі 4 визначення дії нововиділених штамів проводили тільки на одному сорті пшениці ярої і одному тритикале ярого?
4. На підставі чого були обрані сорти для вивчення ефективності бактеризації нововиділеними штамми: сорт Варяг ярої пшениці і сорт Оберіг харківський тритикале? У дисертації говориться про те, що зазначені сорти характеризувались високою потенційною нітрогеназною активністю. Проте виходячи з даних розділу 3 сорти ярої пшениці Етюд і Sunnap, а також Соловей харківський і Коровай харківський тритикале характеризувались найбільш високою нітрогеназною активністю.
5. У розділі 4 (с.72) кількість флуоресціюючих псевдомонад дана у %, а в таблицях 4.1 і 4.2 - у млн.. На с. 92. зазначено, що інокуляція штамом забезпечила прибавку маси рослин, що еквівалентна внесенню 30 кг/га азоту, в той час як на рис.4.7, що це підтверджує, наведено рослини, де було внесено 120 кг/га азоту.
6. У рекомендаціях виробництву технологія вирощування тритикале включає застосування протруювачів і гербіцидів. Сумісність хімікатів і біопрепарату у роботі не досліджувалась. Якщо ці рекомендації було розроблено за участю інших співробітників, необхідно було дати посилання.
7. У списку використаної літератури бажано більше цитувати джерел, що опубліковані за останні 5 років.

ВИСНОВОК

Дисертація Олени Олександрівни Шаховніної «АСОЦІАТИВНА АЗОТФІКСАЦІЯ І ДІАЗОТРОФИ КОРЕНЕВОЇ ЗОНИ ПШЕНИЦІ ЯРОЇ ТА ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО», що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія, є завершеною самостійною науково-дослідною роботою. Оформлення дисертації і автореферату відповідає діючим нормативним документам. За актуальністю теми, об'ємом досліджень, новизною отриманих результатів, науковим та практичним значенням дисертаційна робота Олени Олександрівни Шаховніної відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013р. № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Офіційний опонент
заступник директора з наукової роботи,
головний науковий співробітник відділу
загальної і ґрунтової мікробіології
Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д.К.Заболотного НАН України,
доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України



Г.О. Іутинська

26.01.2017

