

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Лукьяновой Анны Александровны
на тему: «Генетический анализ и разработка видоспецифичной системы
qПЦР детекции фитопатогенов картофеля семейства *Pectobacteriaceae*
по специальностям 1.5.11. «Микробиология» и 1.5.6. «Биотехнология».

Положительные эффекты развития сельскохозяйственных биотехнологий, внедрения в практику новых высокоурожайных сортов культурных растений, к сожалению, в значительной степени нивелируются потерями, вызываемыми болезнями растений – как при культивировании, так и при хранении урожая. Предотвращение заражения посевного материала, эффективный мониторинг распространения фитопатогенов требует массового применения средств диагностики. При этом традиционная оценка внешних симптомов часто не позволяет корректно идентифицировать фитопатоген, что обуславливает активное развитие на протяжении последних десятилетий средств молекулярно-генетической и иммунологической диагностики. Эти разработки обеспечили возможность доказательного выявления основных групп бактериальных фитопатогенов, в большинстве случаев с точностью до рода. Однако разные представители одного рода часто существенно отличаются по характеру взаимодействия с поражаемым растением, скорости распространения инфекции и выраженности патологических процессов. Дополнительная востребованность видоспецифической диагностики возникает при выборе используемых антимикробных агентов. Так, при фаговой терапии состав наиболее эффективного препарата должен определяться с учетом видоспецифичности различных фагов.

На сегодняшний день для приоритетных фитопатогенов сформированы большие коллекции, включающие сотни и тысячи штаммов, для многих из которых проведена детальная характеристика геномов. Это позволяет

корректно выделить границы видов в рамках рода и подобрать зонды, доказательно идентифицирующие каждый из этих видов. С учетом вышеизложенного, исследование А.А. Лукьяновой, направленное на разработку методик ПЦР в режиме реального времени для детекции представителей рода *Pectobacterium*, представляется крайне **актуальным**, в полной мере использующим накопленные на данный момент ресурсы для решения практически востребованной задачи. Оправдан и выбор пектобактерий как объекта исследования: вызываемая ими при поражении клубней и сосудистой системы картофеля мягкая и черная ножка приводят к очень значительным потерям урожая.

Подготовленная и представленная к защите работа, а также публикации А.А. Лукьяновой по теме исследования свидетельствуют об успешном решении поставленных задач. Соискателем проведен подробный анализ имеющихся данных о геномах различных штаммов пектобактерий, охарактеризована их классификация и сформулированы обоснованные рекомендации по ее уточнению. На основании этих данных выбраны уникальные последовательности ДНК для идентификации четырех значимых для сельскохозяйственной практики видов пектобактерий - *P. atrosepticum*, *P. versatile*, *P. parmentieri*, *P. brasiliense*. Разработаны системы ПЦР диагностики этих видов, подтверждена их селективность, показаны высокая чувствительность и применимость при тестировании растительных биопроб на предмет зараженности. Совокупность этих результатов, впервые полученных диссертантом, определяет **научную новизну работы**.

Практическая значимость и конкурентный потенциал разработки обусловлены созданием системы детекции, позволяющей провести видоспецифичную экспресс-детекцию четырех видов рода *Pectobacterium*, выявлять ситуации латентного, бессимптомного инфицирования, и благодаря этому оперативно контролировать качество картофеля, оценивать распространение инфекций, принимать эффективные меры по антибактериальной обработке.

Все работы корректно спланированы и детально описаны в диссертации и статьях. Интерпретация результатов обоснована и опирается на доказательный сравнительный анализ полученного массива данных. Это позволяет однозначно констатировать **достоверность, обоснованность положений, выводов и рекомендаций диссертационной работы.**

Изложение материала в диссертации хорошо структурировано, полностью отражая результаты исследований и их интерпретацию. Автореферат информативно отражает основные результаты исследований и их интерпретацию. По теме диссертации опубликованы 4 статьи в журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science, 1 монография (учебное пособие) и 5 тезисов докладов на конференциях.

При ознакомлении с диссертацией и авторефератом возникли некоторые **замечания и вопросы.**

1. Аналитические параметры разработанных тест-систем для выявления *Pectobacterium* в диссертации представлены как число клеток на 1 мл экстракта. О том, что при пробоподготовке из 100 мг кожуры картофеля получали 200 мкл ресуспендированного после осаждения препарата ДНК, сообщается только в методической части (раздел 3.5); сведения о степени разведения исходной биопробы в дальнейшем не учитываются. В результате для оценки контаминации растительного материала требуется дополнительный поиск этой информации, что затрудняет рассмотрение полученных диссертантом результатов.

2. Диссертантом успешно разработаны системы для селективного выявления четырех распространенных видов *Pectobacterium*. Однако альтернативным решением может быть проведение родоспецифической диагностики с последующей более ресурсозатратной идентификацией видов только для проб, положительных по результатам такого первичного скрининга. При этом выявляются и пектобактерии других видов, не включенных в целевые объекты разработки диссертанта. Оценка возможностей и ограничений такой диагностики была бы полезна.

3. Полученные количественные данные об уровнях контаминации проб картофеля диссертант сравнивает с взятым из литературы порогом, дискриминирующим латентную и симптоматическую инфекцию (рис. 8 автореферата и рис. 31 диссертации). Стоило бы обсудить непосредственные наблюдения для протестированных образцов – наличие или отсутствие у них симптомов заболевания.

4. Полученные данные (раздел 3.23 диссертации) о зараженности картофеля разными видами пектобактерий для выборки из 59 образцов, собранных в 2020-2021 гг. в Московской области, стоило бы сопроводить оценкой того, какие отличия по встречаемости патогенных видов статистически достоверны.

5. В диссертации сообщается (стр. 108) о подборе фагового коктейля, обеспечивающего литическую инфекцию всех четырех рассмотренных патогенов, и складском эксперименте, подтвердившем эффективность этого коктейля. Однако методика эксперимента и количественная оценка его результатов приводятся только в статье в журнале *Viruses*. Расширенное рассмотрение этой части исследования в диссертации было бы полезным элементом при обосновании значимости проведенных разработок.

Вышеизложенные соображения носят частный и дискуссионный характер. Они не умаляют значимости диссертационного исследования, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту, и не снижают общую положительную оценку работы.

Диссертация А.А. Лукьяновой отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспортам специальностей 1.5.11. «Микробиология» и 1.5.6. «Биотехнология», а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертация оформлена согласно приложениям № 5, 6

Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Лукьянова Анна Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. «Микробиология» и 1.5.6. «Биотехнология».

Официальный оппонент:

доктор химических наук, профессор,
руководитель отдела лиганд-рецепторных
взаимодействий и биосенсорики;
заведующий лабораторией иммунобиохимии
Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Дзантиев Борис Борисович

«03» февраля 2023 г.

Адрес места работы: 119071 Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2.
Контактные данные: Тел.: 8-495-954-31-42 . E-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена докторская
диссертация: 03.00.04 – Биохимия

*Подпись сотрудника ФИЦ Биотехнологии РАН
Дзантиева Бориса Борисовича удостоверяю*

Ученый секретарь
ФИЦ Биотехноло



«03» февраля 2023 г.