

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

Актуальность темы исследований. Диссертация А.А. Лукьяновой посвящена разработке новых систем детекции бактериальных фитопатогенов рода *Pectobacterium*, - возбудителей мягкой гнили и черной ножки картофеля. С учетом широкой распространенности таких бактериальных инфекций картофеля, наносимого ими значительного урона урожаю, в том числе в России, а также значением картофеля как основной из сельскохозяйственных культур, актуальность проблемы своевременного обнаружения инфекций и разработки современных методов предотвращения их распространения не вызывает сомнений.

Существующие методы предотвращения развития мягкой гнили картофеля зачастую не обеспечивают полной защиты от инфекций, и обнаружение инфицирования клубней на ранних (латентных) этапах крайне необходимо для контроля и сертификации семенного материала. Применение современных способов биологического контроля заражения, таких как фаготерапия, ограничено тем, что бактериофаги высокоспецифичны по отношению к виду бактерий или даже отдельным штаммам внутри вида. В связи с этим крайне необходимо наличие видоспецифичной экспресс-диагностики штаммов фитопатогенных пектобактерий.

Работа А.А. Лукьяновой сфокусирована на решении этих проблем. Цель и задачи, поставленные в работе, соответствуют тенденциям развития современной микробиологии и биотехнологии.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов диссертационного исследования подтверждена их верификацией с использованием различных современных методов молекулярной биологии, микробиологии, биоинформатики, биотехнологии, характеризующихся высокой специфичностью и воспроизводимостью и выполненных на современном оборудовании. Результаты работы опубликованы в рейтинговых рецензируемых международных изданиях, индексируемых в международных базах Scopus и Web of Science, обсуждены на международных и российских научных конференциях. В целом, достоверность результатов исследования, степень обоснованности положений и заключения, сформулированных в диссертации, не вызывают сомнений.

Научная новизна. На основе анализа полных геномов пектобактерий, доступных в базах данных, упорядочен состав известных таксонов, выявлены некорректно атрибутированные штаммы и проведена их ре-классификация. Для этого осуществлен *in silico* поиск участков последовательностей ДНК, оптимальных для видоспецифической детекции в полногеномных данных. Разработаны методы видоспецифичной диагностики четырех фитопатогенных видов пектобактерий. Показана возможность оценки контаминации клубней картофеля фитопатогенами пектобактерий без выделения чистых бактериальных культур.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработаны и апробированы подходы, позволяющие проводить поиск видоспецифических участков генома в последовательностях полных геномов пектобактерий. Созданы системы детекции четырех видов наиболее распространенных бактериальных фитопатогенов рода *Pectobacterium*, позволяющие определять инфицирование клубней на ранних стадиях. Эффективность диагностикумов продемонстрирована не только на модельных образцах, но и конкретных образцах картофельных клубней урожая 2020 – 2021 года.

Результаты важны для разработки новых систем диагностики и контроля контаминации картофеля фитопатогенами, в том числе, на основе фаготерапии.

Содержание и структура диссертационной работы

Диссертация написана по общепринятому плану и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследований, результатов экспериментов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы и приложений. Работа изложена на 130 страницах, содержит 31 рисунок, 10 таблиц и 3 приложения. Список литературы включает 115 источников, из них 6 отечественных, и 9 источников являются самоцитированием.

В главе «Введение» обосновывается актуальность выбранной темы, представлены цель, задачи, обозначены научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту, указан объем и структура диссертации и количество печатных материалов, опубликованных по теме диссертации.

Обзор литературы (Глава 2) состоит из 5 основных разделов. В обзоре представлено современное состояние проблемы, которой посвящено исследование. Приводятся данные об истории картофеля, его распространенности в мире и в России, анализируется информация о фитопатогенах, поражающих растения и клубни картофеля, и наносимом ими уроне, и в частности, о бактериальных фитопатогенах картофеля. Среди фитопатогенов автор обоснованно выделяет возбудителей мягкой гнили и черной ножки картофеля – пектобактерии. Приводятся видовые особенности фитопатогенов рода *Pectobacterium*, их распространенность, описывается механизм патогенеза, факторы, влияющие на инфекцию, и способы распространения данной инфекции, а также известные способы борьбы с мягкой гнилью, вызываемой фитопатогенами пектобактерий, среди которых основное внимание автором уделено биологическим методам, включая фаготерапию.

Значительная часть обзора посвящена современному состоянию систематики пектобактерий и проблемам пересмотра молекулярных методов детекции. Автор обоснованно аргументирует необходимость реклассификации части видов этих бактерий.

В заключительной части обзора приводится характеристика известных методов идентификации пектобактерий, вызывающих мягкую гниль картофеля, включая молекулярно-биологические методы с использованием ПЦР, обоснована необходимость разработки новых методов видоспецифичной детекции фитопатогенных пектобактерий.

В Главе “Материалы и методы” (Глава 3) подробно описаны методы, использованные в работе. Методы адекватны поставленной цели и задачам исследования и включают большой арсенал современных методов микробиологии, биоинформатики, молекулярной биологии и биотехнологии. В качестве небольшого замечания по этой части можно отметить отсутствие подраздела “Материалы” и раздела, характеризующего статистическую обработку данных.

Результаты исследований и их обсуждение изложены в Главе 4. Эта глава посвящена геномному анализу с использованием доступных полных геномов пектобактерий, поиску *in silico* участков в полных геномах для видоспецифичной амплификации, проверке селективности разработанными наборами олигонуклеотидов и верификации селективности с помощью ПЦР в реальном времени, оценке чувствительности и эффективности ПЦР и тестированию разработанных тест-систем на модельных объектах и образцах картофеля урожая 2020-2021 г. В целом, результаты свидетельствуют о большом объеме проделанной диссертантом работы и решению важной научно-практической задачи по созданию новых систем детекции латентных инфекций картофеля фитопатогенными пектобактериями.

В заключении автор обобщает полученные результаты. Завершается диссертация выводами, которые полностью обоснованы, соответствуют цели и задачам диссертационного исследования.

Автореферат адекватно отражает содержание диссертации.

В целом, диссертация А.А. Лукьяновой является оригинальным и высококачественным исследованием, имеющим высокую научную и практическую значимость.

Принципиальных замечаний по работе нет, но при ознакомлении с диссертацией возникли ряд вопросов :

- 1) зависит ли инфицируемость пектобактериями от сорта картофеля? Есть ли такие данные?
- 2) как вы оцениваете перспективы создания и применения устойчивых к мягкой гнили новых сортов картофеля?
- 3) В эксперименте использовались 58 клубней одного сорта, из одной партии, одного срока хранения? Почему? Не считаете ли вы целесообразным оценить различные сорта картофеля различных сроков хранения, чтобы подтвердить универсальность разработанных диагностических методов?

Имеются замечания непринципиального характера:

1) На стр. 15 указано, что «В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю». Это вызывает вопросы, поскольку лишь в двух статьях из списка диссертант является первым автором.

2) На стр. 17-18 и рис.1 приведены данные по мировому рынку картофеля, однако данные, приведенные в тексте, а также на рисунке 1А и рис 1В расходятся. Так, на стр. 17 приводится цифра мирового производства 360 млн тонн, на рисунке 1А только для стран, обозначенным красным цветом указано 4 710 984 млн тонн, и это не соответствует данным,

представленным на рисунке 1В. По всей видимости, подпись к рисунку 1А ошибочна

3) Таблица 1 “Видовые особенности фитопатогенов рода *Pectobacterium*” – не указан использованный источник информации. В подписи к этой таблице также желательно было бы обозначить критерии отнесения штаммов, соответственно к положительным, отрицательным или переменным.

4) В главе «Материалы и методы» отсутствует подраздел «Материалы».

5) В главе “Материалы и методы” отсутствует раздел “Статистическая обработка данных”. Статистическая обработка описана только для одного из использованных методов.

6) На странице 56 указано «Для ряда штаммов было проведено полногеномное секвенирование». В материалах и методах не приводится методика полногеномного секвенирования. В результатах не приводятся данные о том, геномы каких именно штаммов были секвенированы.

7) Стр. 59-60. Автор пишет: «Например, при поиске видоспецифичных участков *P. atrosepticum*, позитивная база состояла из 60 реформатированных с помощью BLAST геномов». Что подразумевается под реформатированием геномов с помощью BLAST и как проводилось это реформатирование?

8) На странице 63 есть два подраздела: “3.4. Выделение геномной ДНК из бактерий” и “3.5. Выделение ДНК из картофеля”. Однако, в разделе 3.5 речь идет в том числе о выделении бактериальной ДНК из клубней картофеля, т.е. название раздела 3.5 не совсем корректно.

9) на странице 64 указано: «Последовательности праймеров для каждого выбранного участка приведены в разделе 4.2.», однако раздел 4.2 в диссертации отсутствует. Последовательности праймеров приведены в разделе 3.18. Кроме того, представляется более логичным привести последовательности праймеров в методах.

10) на странице 67 приведено описание смеси для лигирования плазмиды и амплифицированного участка ДНК: «Реакционная смесь (10 мкл) для лигирования содержала: 1 мкл Quick-TA T4 ДНК лигазы, 1 мкл 10x буфера для лигирования, 8 мкл свежечищенного ПЦР продукта», однако, сама плазида не указана.

11) на странице 88 указывается, что «для видоспецифичной детекции другого вида, *P. parmentieri*, было показано, что амплификация также прошла со всеми образцами, содержащими ДНК целевого вида, то есть F034, F127, F148, F149, F174», а на странице 87 указывается, что к виду *P. parmentieri* относятся штаммы F127, F148, F149, F174, но не штамм F034.

12) на странице 89 указано, что «...идентификация штаммов *P. brasiliense* (Рисунок 22) выявила целевые штаммы F126, F128, F152 и F157», однако штамм *P. brasiliense* F128 не значится среди штаммов, задействованных в данном эксперименте (стр. 87)

13) Стр. 89. Автор пишет: «Амплификация с праймерами PparF и PparR позволила уточнить видовую принадлежность штамма F035 как *P. parmentieri*». Не понятна логика этого утверждения. И так, изначально делался ПЦР различных штаммов, в том числе и F035, чтобы определить специфичность тест-системы, основанной на ПЦР с праймерами PparF и PparR. У штамма F035 ПЦР с данными праймерами прошел успешно. И то, что данный штамм относится к *P. parmentieri*, то есть, по сути, селективность этого ПЦР-теста подтвердили с помощью ПЦР с теми же праймерами. То есть селективность ПЦР с праймерами PparF и PparR подтвердили, по факту ПЦР с праймерами PparF и PparR?

14) на странице 96 в Таблице 5 есть столбцы, обозначенные как «Cq». Следовало бы указать, что означает эта аббревиатура

15) Стр. 59. Рисунок 9. Первым этапом поиска видоспецифичных последовательностей значится «Сбор геномов представителей целевой и нецелевой групп». Обычно под сбором (сборкой) геномов подразумевают

сборку геномов *de novo*, то есть биоинформатический этап секвенирования геномов. В данном же случае уместнее говорить про отбор геномов.

16) На странице 63 автор пишет: «Для выделения тотальной (геномной и бактериальной) ДНК...». Что значит – геномной и бактериальной? Разве бактериальная ДНК не является геномной?

17) Стр. 64. Автор пишет: «Изопропанол заменяли 70% этанолом, центрифугировали 5 мин при той же скорости, повторяли процедуру дважды». Получается, что на каждой стадии заменяли изопропанол этанолом. Более логично описать этот этап как, например, «Супернатант (изопропанол) сливали, а содержащий ДНК осадок столько-то раз промывали 70% этанолом».

Другие недочеты оформительского характера:

- Вызывает недоумение нумерация подразделов раздела 4. Если в разделах 1-3 нумерация подразделов соответствует разделу (в разделе 1 идут подразделы 1.1, 1.2, 1.3, в разделе 2 - подразделы 2.1, 2.2, и так далее), то в разделе 4 нумерация начинается с пункта 3.17 и т.д.

- Стр. 73. Раздел 3.16 называется «Тестирование системы детекции собранных в Московской области в 2020-2021 годах». Вероятно, имеется ввиду “собранных клубней”?

Вместе с тем, указанные замечания не имеют принципиального характера и не влияют на позитивную оценку диссертационного исследования в целом. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту 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, 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 биологических наук,
главный научный сотрудник,
заведующая лабораторией микробиологической
трансформации органических соединений
Института биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина ФИЦ «Пушинский научный центр
биологических исследований» Российской Академии наук

Донова Марина Викторовна



01.02.2023

Дата подписания

Контактные данные: тел.: +79671083319, e-mail: donova@ibpm.pushchino.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация:

03.00.07 - микробиология

Адрес мес

142290, г.

