

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».

Актуальность темы исследования

В условиях расширения промышленного растениеводства, нацеленного на экспорт сельскохозяйственной продукции, и на фоне климатических изменений, в Российской Федерации увеличивается вредоносность бактериальных болезней растений. Она обусловлена как прямыми потерями урожая, так и потенциальным ущербом, связанным с обнаружением регулируемых фитопатогенных организмов в экспортируемой из России продукции в целевых странах – покупателях. Одной из основных проблем, с которой сталкиваются специалисты по защите и карантину растений и селекционеры – необходимость рутинного применения инструментальных методов диагностики вида бактериальных патогенов. В силу низких порогов толерантности, особенно для семян и посадочного материала, диагностика бактериальных патогенов растений в основном базируется на принципе амплификации бактериальной ДНК, чаще всего – при помощи различных модификаций полимеразной цепной реакции (ПЦР). Одна из наиболее сложных для диагностики групп фитопатогенных бактерий – пектолитические энтеробактерии (*Pectobacteriaceae*) – семейство, включающее большое число видов, способных поражать очень широкий спектр растений. Ряд видов этой группы способен инфицировать товарный и семенной картофель. Мягкая гниль и черная ножка, которые вызываются пектобактериями, уносят до 30% урожая картофеля ежегодно, даже без учета потерь во время хранения. В условиях снижения производства картофеля в

РФ из-за целого ряда причин, эти потери ставят под угрозу продовольственную безопасность страны.

Основным приемом снижения потерь от бактериозов картофеля является сертификация семенного материала. Государственные стандарты оценки зараженности семян картофеля – один из немногих примеров постоянной актуализации методов диагностики фитопатогенов, в том числе ПЦР анализа. Технологическим приемом, который мог бы снизить потери картофеля при хранении, является обработка клубней биологическими антимикробными агентами, в частности бактериофагами. Однако, как правило, фаги специфичны к одному виду или даже штамму внутри вида, и для их использования необходим постоянный мониторинг видового состава возбудителей бактериозов.

Наличие современного, быстрого и относительно доступного метода видоспецифичной диагностики – основа борьбы с пектолитическими энтеробактериями. В последние годы было описано более десятка новых видов, а границы старых таксонов переформированы. Как правило, наиболее агрессивные виды патогенов принадлежат к недавно обнаруженным и идентифицированным таксонам внутри этого семейства, например *P. brasiliense*. До 2012–2013 гг. *P. brasiliense* не был выявлен в странах Европы, однако в настоящий момент данный патоген распространен не только в Европе, но и в России. Для этих новых патогенов средств видоспецифичной диагностики разработано не было, а специфичность старых диагностических методов постоянно размывается. В силу вышеизложенных причин, тема диссертационной работы Лукьяновой Анны Александровны является высоко актуальной.

Представленная к защите работа посвящена разработке системы детекции представителей рода *Pectobacterium* - возбудителей мягкой гнили картофеля на основе использования метода количественной ПЦР в режиме реального времени (qПЦР). В ходе выполнения работы соискателем был

проведен геномный анализ бактерий рода *Pectobacterium*, найдены уникальные последовательности ДНК для идентификации наиболее агрессивных (*P. atrosepticum*) и наиболее распространенных (*P. versatile*, *P. parmentieri*, *P. brasiliense*) представителей *Pectobacterium*, разработаны и валидированы системы детекции этих видов рода *Pectobacterium* по критериям специфичности, чувствительности теста и возможности детекции бактерий рода *Pectobacterium* в растительных образцах. Проведено изучение актуальных популяций возбудителей бактериозов картофеля в Московской области, на основе которого была построена успешная схема применения бактериофагов в реальном секторе производства.

Достоверность исследования

Достоверность полученных результатов обусловлена значительным количеством проведенных экспериментальных исследований и статистической обработкой результатов. Достоверность результатов подтверждена публикациями в рецензируемых научных журналах и апробацией результатов на научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 10 научных работ. Среди них 4 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова, 1 монография и 5 тезисов докладов на конференциях. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Научная новизна работы

Впервые детально изучены таксономические особенности актуальной популяции фитопатогенных бактерий рода *Pectobacterium* с учетом их геномных особенностей, что позволяет понять филогенетические взаимосвязи внутри данного таксона и спрогнозировать возможность описания новых видов. Разработанный для проведения данного исследования алгоритм позволяет проводить автоматизированный поиск видоспецифичных

участков в последовательностях бактериальных полных геномов, и создавать на их основе диагностикумы для наиболее важных видов и внутривидовых групп бактериальных патогенов. Полученные результаты и методические подходы могут быть применены не только в отношении бактерий рода *Pectobacterium*, но также и для других фитопатогенных бактерий.

Практическая значимость исследования обусловлена созданием системы детекции, позволяющей провести вид-специфичную экспресс-детекцию четырех видов рода *Pectobacterium*, возбудителей мягкой гнили и черной ножки в одном образце (растении, почве, воде). Метод позволяет дифференцировать актуальные виды *Pectobacterium versatile*, *P. brasiliense*, *P. parmentieri* и *P. atrosepticum*. Разработанный диагностикум имеет чувствительность достаточную для определения латентной инфекции, что актуально для определения зараженности селекционного материала и семян картофеля и других культур, поражаемых фитопатогенными энтеробактериями.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Лукьяновой А.А. включает «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», и «Список литературы». Работа изложена на 150 страницах, содержит 31 рисунок, 10 таблиц и 3 Приложения. Список литературы включает 115 источников, из них 6 на русском и 109 на иностранных языках. Обзор литературы состоит из пяти разделов, описывающих картофель, как сельскохозяйственную культуру, разнообразие бактериальных инфекций картофеля и наиболее вредоносные фитопатогенные бактерии группы пектолитических энтеробактерий. Отдельно представлены сведения о таксономии группы и изменениях систематики семейства *Pectobacteriaceae*, произошедшие в последние годы, и о существующих методах детекции пектолитических энтеробактерий. В главе «Материалы и методы» подробно описаны штаммы бактерий и условия

культивирования, методы проведения геномного анализа, включая сравнение среднегеномного сходства (average nucleotide identity, ANI) и филогенетического анализа с использованием последовательностей 221 полных и драфт геномов представителей семейства *Pectobacteriaceae*, размещённых в базе данных NCBI GenBank. Поиск видоспецифичных последовательностей и дизайн олигонуклеотидов для разработки видоспецифичных qПЦР тест-систем проводили с помощью сравнения коротких участков генома, относящихся в целевой группе, состоящей из всех штаммов целевого вида, и отсутствующих или существенно отличающихся в остальных штаммах, не принадлежащих к целевому виду. При выборе видоспецифичной последовательности для конструирования праймеров учитывали возможные функции гена, содержащего видоспецифичный участок. Для определения чувствительности и эффективности ПЦР Для определения предела чувствительности метода была определена зависимость порогового цикла (C_q) от логарифма количества копий целевой последовательности ДНК на реакцию. Тестирование системы детекции провели также на искусственно зараженных растениях.

Раздел «Результаты и обсуждение» подробно описывает полученные в итоге экспериментов данные и их анализ. Геномный анализ был необходим для того, чтобы создать базы данных каждого интересующего таксона и исключить из них некорректно атрибутированные геномы. Как показали вычисленные значения ANI, для многих представителей рода *Pectobacterium* характерно высокое общегеномное сходство и ANI близки к пороговым. Для некоторых близких видов, например, *P. carotovorum* и *P. versatile*, *P. polaris* и *P. parvum* эти значения могут быть и вовсе выше пороговых. В то же время, между этими видами могут быть важные отличия, которые можно выявить другими методами анализа. Кроме того, было показано, что филогенетическое дерево порядка *Enterobacterales* на основе полных

последовательностей генов 16S рРНК группирует в одну кладу не только представителей разных родов, но и представителей разных семейств.

Алгоритм UBCG (up-to-date bacterial core gene set), разработанный на основе 92 конкатенированных консервативных генов более точно группирует штаммы рода *Pectobacterium* в клады, соответствующие описанным видам, в том числе позволяет четко различить близкие виды, что было невозможно сделать, пользуясь анализом общегеномного сходства.

В результате проделанного анализа были сформированы базы данных, включающие все штаммы-представители полученных клад для четырёх целевых видов пектобактерий: *P. atrosepticum*, *P. versatile*, *P. parmentieri*, *P. brasiliense*.

В результате применения разработанного алгоритма поиска вид-специфичных последовательностей, для каждого целевого вида был определен ген, потенциально подходящий для видоспецифичной амплификации, а также сконструированы праймеры и зонды для амплификации короткого участка выбранной последовательности. Для первичной проверки корректности видоспецифичной детекции при помощи амплификации выбранных участков генома был подобран набор из 39 штаммов лабораторной коллекции бактерий рода *Pectobacterium* различных видов, а также представителей родственного рода *Dickeya*. Все выбранные штаммы были хорошо изучены, для многих из них доступны данные полногеномного секвенирования и ошибка в отнесении к тому или иному виду, таким образом, исключена. Для всех четырех систем детекции также была показана высокая селективность, наличие амплификации со всеми целевыми штаммами и отсутствие сигнала с изолятами других видов. В результате проведенных исследований сделан обоснованный вывод о пригодности разработанного метода для создания диагностикумов, применимых для оценки бактериального осеменения картофеля без визуальных проявлений симптомов инфекции. Апробация системы детекции была проведена на

выборке 59 образцов, собранных в Московской области в 2020-2021 годах. Полученные данные согласуются с результатами мониторинга 2010-2014 годов., в котором референтными методами выявляли зараженность картофеля рядом важных бактериальных фитопатогенов,

На основании данных, полученных в ходе идентификации штаммов энтеробактерий был подобран фаговый коктейль, содержащий бактериофаги, вызывающие литическую инфекцию всех четырех патогенов, на которых была сфокусирована данная работа. Использование смеси описанных фагов позволило существенно снизить риск порчи картофеля в производственном эксперименте и таким образом показало свою высокую эффективность как средство профилактики развития мягкой гнили (Bugaeva et al., 2021).

В разделе «Заключение» Автор подводит итоги выполненной работы.

Выводы работы строго соответствуют поставленной цели, определенным задачам, и результатам проведенным Автором теоретических и практических исследований.

Несмотря на общий высокий уровень представленной диссертации, у рецензента есть некоторые вопросы и замечания по оформлению работы и использованию Автором некоторых терминов:

- 1) Часто встречающееся в работе названия «гнилостные поражения» и «мягкогнилостные пектобактерии» не встречаются в фитопатологической литературе, желательно было бы обосновать введение данных терминов в практику.
- 2) Упомянутое во Введении и на стр. 20 Диссертации включение представителей родов *Pectobacterium* и *Dickeya* в список 10 наиболее опасных бактериальных фитопатогенов (Mansfield et al., 2012) было сделано на основе личного мнения опрошенных авторов статей в журнале «Molecular Plant Pathology» Британского общества фитопатологов. Желательно привести более обоснованную оценку.

- 3) В обзоре литературы не отражен факт применения в качестве стандартных методов анализа чистоты семян картофеля визуального и ИФА анализа, обладающих недостаточной чувствительностью и специфичностью для выявления латентной инфекции, что делает ПЦР анализ практически безальтернативным методом выявления бактериальной инфекции на ранних этапах размножения картофеля, полный цикл которого занимает до 7 лет.
- 4) На стр. 16 диссертации указано, что «Высокая урожайность картофеля делает его экономически выгодной кормовой культурой. С одного гектара земли в среднем можно получить 150-200 центнеров картофеля либо всего 30-50 центнеров зерна.» Данное сравнение не правомочно, потому что содержание воды в зерне составляет не более 14% , а в картофеле – от 64 до 86%.
- 5) На странице 20 указано, что «Ежегодно от насекомых-вредителей и инфекционных болезней растений теряется порядка 22% мирового урожая.». По данным ФАО, приведенным в кануне Международного года защиты растений (2020), общие потери от вредных объектов достигают 40% урожая сх культур, не считая потерь во время хранения (Resolution adopted by the General Assembly on 20 December 2018 73/252. International Year of Plant Health.: https://www.un.org/en/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/73/252).
- 6) На стр. 21 и 22 большое внимание уделено двум другим бактериальным патогенам картофеля (*Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter sepedonicus*), но не упомянуто, что эти патогены значительно усиливают (до 10 раз) распространение и вредоносность пектолитических энтеробактерий на картофеле.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. 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, а также 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 сельскохозяйственных наук,
доцент,
директор агробиотехнологического департамента
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

Пакина Елена Николаевна
03.02.2023 г.



Контактные данные:

тел.: +7 985 3472754, e-mail: e-pakina@yandex.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена

диссертация: 4.1.1 Общее земледелие, растениеводство

Адрес места работы:

117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

