

УТВЕРЖДАЮ:
Директор Федерального
государственного бюджетного
научного учреждения
«Прикаспийский аграрный
федеральный научный центр
Российской академии наук»,
Д.С. Х.н., член-корр. РАН



Н.В. Тютюма
2024 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации - Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Прикаспийский аграрный федеральный научный центр Российской Академии Наук» на диссертационную работу Кавиза Ньяша Джон на тему: «Analysis of biological properties and improvement of molecular genetic methods for diagnosing the phytopathogen *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*» / «Анализ биологических свойств и совершенствование молекулярно-генетических методов диагностики фитопатогена *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*», представленную к защите в диссертационный совет ПДС 20121.002 на базе ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.3. Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений.

Актуальность темы. Существенной проблемой при производстве сельскохозяйственных культур являются прямые и косвенные потери, вызываемые фитопатогенными микроорганизмами, среди которых серьезный ущерб причиняют бактерии, большинство из которых способны сохраняться в почве, передаваться с семенным материалом, что затрудняет методы контроля. Помимо известных фитопатогенных бактерий, поражающих овощные культуры, особую опасность представляет внедрение новых видов, а также карантинных штаммов уже существующих патогенных микроорганизмов. Как правило, карантинные штаммы обладают инвазивным действием и имеют способность быстро распространяться еще до того, как будет оценена потенциальная угроза сельскохозяйственному производству. В

связи с этим крайне важно точно и своевременно диагностировать патогена на начальном этапе выявления, а недостаток соответствующих диагностических технологий может существенно увеличить риски и привести к необратимым последствиям. Особую опасность представляет инфекция, передаваемая с семенным материалом, к которой относится листовая ожог лука, вызываемый протобактерией *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* и снижающий урожайность культуры до 50%. На вегетирующем растении бактерия проникает внутрь хозяина через устьица и быстро размножается, особенно в периоды высокой влажности. Для быстрой и точной идентификации *X. euvesicatoria* pv. *allii* необходима разработка надежного и высокочувствительного диагностического протокола. В 2010 году были разработаны ПЦР анализ на основе целевого гена эффектора *avrRxv* и генов пилина (*pilW* и *pilX*). При этом, когда ПЦР тестировали исключительно на бактериях рода *Xanthomonas*, большинство штаммов не продуцировали ампликоны, за исключением 9 штаммов из *X. axonopodis* подгрупп 9.1 и 9.2, которые не являются патогенными для лука. До разработки ПЦР-анализа основными методами идентификации данного вида бактерий были тесты на патогенность, обычно в сочетании с молекулярным типированием, проводимым после выделения патогена на селективных средах. Эффективность таких методов не была невысокой, в связи с тем, что при низких концентрациях бактерий часто получали ложноотрицательные результаты, кроме того эти методы диагностики были длительны по времени.

Научная новизна. Автором была выявлена достоверная корреляция между методом выделения ДНК и эффективностью ПЦР-анализа, что привело к усовершенствованию ПЦР-диагностики. Был впервые предложен и протестирован зонд ВНЗ (Black Hole Quencher®) в качестве альтернативы зонду МГВ (Minor Groove Binder, Applied Biosystems TaqMan, USA), который показал совместимость как с праймерами AVR, так и с праймером PIL. В ходе исследования воздействия болезней *in-planta* на различные части растений лука выявлено, что бактерии размножались более интенсивно и дольше сохранялись в верхушке луковицы растения. Было обнаружено влияние *X. euvesicatoria* pv. *allii* на жизнеспособность и энергию прорастания семян лука.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные соискателем результаты исследований усовершенствовали и оптимизировали диагностический ПЦР протокол для идентификации одного из наиболее опасных патогенов лука *X. euvesicatoria* pv. *allii*. Результаты исследования позволят существенно улучшить идентификацию данного карантинного объекта службами фитосанитарного надзора. Автором расширены знания о

биологии патогена, определен источник вторичного заражения и потенциальный источник эпифитотии.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций. Степень обоснованности и достоверности результатов исследований вытекает непосредственно из экспериментальных данных, полученных в лабораторных и полевых условиях. Представленное автором заключение четко сформулировано и логически вытекает из материалов исследований.

Научная специальность, которой соответствует диссертация. Диссертационная работа соответствует научной специальности 4.1.3. Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений (пункты 3.1. «Диагностика вредных организмов, оценка вредоносности и фитосанитарных рисков», 3.2. «Биологические, экологические особенности и методы исследований вредных организмов»).

Оценка содержания диссертации. Во введении автором обоснована актуальность исследований, описана степень разработанности темы, приведены цель и задачи исследований, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследований. Сформулированы положения, выносимые на защиту, степень достоверности полученных результатов, представлены данные об апробации работы.

В первой главе («Обзор литературы») автор подробно анализирует современные зарубежные и российские литературные источники, рассматривает степень изученности вопроса, характеризует ареал распространения объекта исследований, его жизненный цикл, экономические риски и существующие методы идентификации и контроля. Подробный анализ имеющихся в научной литературе сведений позволил автору четко сформулировать цель и задачи исследований.

Во второй главе («Материал и методы исследований») подробно изложены условия, материал и методы проведения исследований, методика определения чувствительности, специфичности и воспроизводимости классической ПЦР и ПЦР в реальном времени для идентификации *X. euvesicatoria* pv. *allii*, микробиологического анализа сред роста исследуемого патогена.

В третьей главе («Результаты и обсуждение») представлены результаты определения чувствительности классической ПЦР и ПЦР в реальном времени для идентификации *X. euvesicatoria* pv. *allii*, оценки специфичности ПЦР-анализов на *X. euvesicatoria* pv. *allii*,

Вопросы и замечания по работе.

1. При анализе чувствительности на рисунке 3 автореферата (и в диссертации) при самой высокой и самой низкой концентрации (разведениями) разница не ощутима. Имел ли смысл работать с суспензиями чистых культур, когда анализировать чувствительность необходимо в растительном образце (экстракте). Уровень аналитической чувствительности может быть абсолютно разным.

2. В тексте диссертации и в автореферате на странице 16 и 17 автором использованы разные способы написания *Allium species*, *Allium species*, *Allium sp.p* Представляется целесообразным единообразное написание обозначений.

3. В главе «Результаты и обсуждение» нарушена ссылка по тексту на таблицы с результатами. Несоответствие возникает с таблицы 21 и далее по тексту. При таком объеме данных теряется цель анализа и соотнести полученные результаты невозможно. Например, рядом с таблицей 29 имеется ссылка на таблицу 14.

4. Из работы неясно чем был обоснован выбор фитопатогенных бактерий при тестировании предложенных методов диагностики для обнаружения *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*., поскольку большинство из них не относится к патогенам лука.

Заключение.

Диссертационное исследование Кавиза Ньяша Джон «Analysis of biological properties and improvement of molecular genetic methods for diagnosing the phytopathogen *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*»/«Анализ биологических свойств и совершенствование молекулярно-генетических методов диагностики фитопатогена *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи совершенствования методов точной и быстрой диагностики бактериальных патогенов, что найдет широкое применение в службах фитосанитарного надзора. Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, согласно п.2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», утвержденного Ученым советом РУДН, протокол

УС-12 от 03.07.2023г., а ее автор, Кавиза Ньяша Джон, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.3. Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений.

Отзыв на диссертацию и автореферат обсуждены на заседании лаборатории селекции сельскохозяйственных культур и утвержден на заседании ученого совета ФГБНУ «ПАФНЦ РАН» (Протокол № 3 от 14.06.2024 года)

Заведующая лабораторией

селекции сельскохозяйственных культур

кандидат сельскохозяйственных наук



Н.А. Зайцева

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Прикаспийский аграрный федеральный научный центр Российской академии наук»

416251, Астраханская обл., Черноярский р-н., с. Соленое Займище, квартал Северный, 8, e-mail: pniiaz@mail.ru; телефон: 8(85149)25-7-20

Подписи: директора ФГБНУ «ПАФНЦ РАН», член-корр. РАН Тютюма Н.В., зав. лаб. селекции сельскохозяйственных культур к.с.-х.н. Зайцевой Н.А. заверяю:

Специалист по кадрам



Петрова Ю.К.