

УТВЕРЖДАЮ:
Директор Федерального
государственного бюджетного
научного учреждения

«Федеральный научный
центр овощеводства»

д.с.-х.н., академик РАН

А.В. Солдатенко

26.08. 2024 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО) на диссертационную работу Мувинги Муфаро «Development and optimization of methods for the detection and identification of bacterioses that are significant to the export and import of Russian grain products / Разработка и оптимизация методов выявления и идентификации бактериозов, значимых для экспорта и импорта Российской зернопродукции», представленную к защите в диссертационный совет ПДС 2021.002 на базе ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» на соискание учёной степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.3. Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений.

Актуальность темы. Фитопатогенные бактерии могут наносить существенный ущерб урожаю сельскохозяйственных культур и распространяться на новые территории вместе с посевным и посадочным материалом. Такие стратегически значимые культуры для Российской Федерации, как пшеница, ячмень, и другие зерновые, также подвержены бактериальным болезням. В число наиболее опасных и вредоносных видов входят возбудитель черного бактериоза *Xanthomonas translucens*, возбудитель бурой бактериальной гнили влагалища листа злаковых культур *Pseudomonas fuscovaginae*, возбудитель базального и ореольного бактериоза *Pseudomonas syringae* и карантинный для стран Евразийского экономического союза возбудитель желтого слизистого бактериоза пшеницы *Rathayibacter tritici*. Единственным на сегодняшний день способом контроля бактериозов служит своевременная идентификация фитопатогенных бактерий в семенах до посева. Кроме того, лабораторной диагностике подвергаются образцы от партий зернопродукции при импорте и экспорте. Методы лабораторной диагностики большинства бактериозов зерновых культур требуют разработки и оптимизации, в связи с этим, диссертационное исследование

Мувинги Муфаро, посвященное разработке и оптимизации методов выявления и идентификации бактериальных возбудителей, значимых для импорта и экспорта зернопродукции Российской Федерацией, является весьма актуальной.

Научная новизна. Впервые автором применены методы ПЦР и секвенирования для исследования зараженности фитопатогенными бактериями растительных образцов зерновых культур из трёх регионов РФ (Москвы, Ставропольского края и Республики Крым). В результате обнаружено заражение *Xanthomonas translucens* и *Pseudomonas syringae*. Кроме идентификации объектов исследования, в растительных образцах определен состав культивируемой бактериальной микробиоты. С помощью биоинформатического анализа 171 генома бактерий рода *Xanthomonas* найдены уникальные для *Xanthomonas translucens* нуклеотидные последовательности, к которым подобраны новые праймеры для ПЦР-идентификации этого вида. Усовершенствован метод подготовки проб зерна, что позволило сократить время анализа на наличие возбудителей бактериозов до 6 часов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Автором проведен обзор актуальных зарубежных и российских научных публикаций, в результате собрана и обобщена необходимая для разработки диагностических протоколов информация о наиболее значимых для импорта и экспорта зерна видах бактерий. Апробированы и оптимизированы все основные процессы лабораторного анализа, такие как пробоподготовка, культуральный метод и ПЦР. Проведена оценка применимости некоторых ПЦР-тестов. Результаты исследований, проведенных соискателем, использованы при разработке методических рекомендаций по выявлению и идентификации возбудителей бактериозов зерновых культур.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций. Экспериментальные данные, полученные в ходе использования на большом экспериментальном материале современных общепринятых методов, корректно проанализированы и согласуются с теоретическими научными положениями в исследуемой области, что подтверждает достоверность результатов исследований, на основании которых сформулированы выводы.

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

Оценка содержания диссертации. Диссертационное исследование Мувинги Муфаро состоит из введения, трёх глав, заключения, изложено на

193 страницах, содержит 31 таблицу, 54 рисунка и 142 источника литературы.

Во введении соискателем обоснована актуальность исследования, определены цель и задачи, представлена научная новизна, теоретическая и практическая значимость, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

Глава 1 представляет собой обзор актуальных зарубежных и российских источников литературы и содержит проанализированную автором диссертации информацию о фитосанитарном регулировании, систематическом положении, распространении, морфологии, биологических особенностях и методах идентификации возбудителей бактериозов зерновых культур.

Глава 2 содержит подробное описание материалов и методов исследования. Автором детально охарактеризованы штаммы бактерий и растительные образцы, с которыми проведены опыты. Подробно и последовательно изложены методы сбора растительных образцов, пробоподготовки, выделения нуклеиновых кислот, оптимизации метода подготовки проб семян для анализа, посева бактерий и растительных проб на питательные среды, ПЦР и секвенирования. Детально изложен метод поиска видоспецифичных генетических мишеней бактерии *Xanthomonas translucens* и разработки новых ПЦР-тестов для её идентификации. Следует отметить внушительный объем материала для исследований и трудоемкость проведенных работ.

В главе 3 приведены результаты сбора образцов зерновых культур с территорий полевой опытной станции РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 3-х районов Республики Крым и 8-ми районов Ставропольского края. Показаны результаты разработки и оценки применимости новых видоспецифичных для *Xanthomonas translucens* ПЦР-тестов. Представлены результаты сравнения характеристик питательных сред для изоляции *Rathayibacter tritici*. На основании проведенных опытов по оптимизации и унификации метода пробоподготовки семян автором представлен способ, применимый для последующей идентификации всех бактерий – объектов исследования. Оптимизированный метод существенно сократит затраты времени и труда как при анализе на наличие одного патогена, так и при комплексном исследовании. В результате анализа собранных в 3-х регионах РФ образцов растений зерновых культур (181 шт.), в том числе, с применением разработанных автором новых ПЦР-тестов, показано наличие *Xanthomonas translucens* в одном образце пшеницы и зараженность *Pseudomonas syringae* 41% всех проанализированных образцов. *Rathayibacter tritici* и *Pseudomonas fuscovaginae* не обнаружены. Этот же растительный материал использован для комплексного анализа биоразнообразия культивируемых бактерий, автором выделено, идентифицировано и охарактеризовано 434

бактериальных изолята, при этом, все они сохранены в коллекции и могут быть использованы для дальнейших исследований.

Замечания и предложения. Наряду с несомненными достоинствами рассматриваемой диссертационной работы, имеется ряд замечаний дискуссионного характера:

1. Автор в актуальности и степени разработанности темы отмечает, что на момент начала исследования отсутствовали утвержденные в Российской Федерации методические рекомендации по выявлению и идентификации целого ряда бактерий: *Pseudomonas fuscovaginae*, различных патоваров *P. syringae* и *Xanthomonas translucens*, *Rathayibacter tritici*, что не позволяют достоверно проводить их диагностику. Не понятно, почему в задачи исследований ставит разработку метода ПЦР-диагностики только для идентификации *Xanthomonas translucens*, а определение оптимальной питательной среды для выделения – только для *Rathayibacter tritici*?

2. Несколько «размыто» представлена новизна исследований, в которой конкретно не указывается, что исследователь сделал впервые для отечественной или мировой науки. Перечисляются больше методические аспекты.

3. Раздел 1.2. автор посвятил обзору литературы, касающегося влиянию климатических условий в целом на территории РФ на выбор культур для выращивания, их урожайность. Но актуальнее было бы этот раздел посвятить только тем регионам, на территории которых проводили исследования, и осветить в нем вопросы: площади, занятые под зерновыми культурами в данных регионах; целесообразность их выращивания в связи с существующей в настоящее время фитопатологической обстановкой; характерные почвенно-климатические условия и их влияние на урожайность конкретно в этих регионах.

4. Исследователем не указано, почему Московский, Ставропольский регион и Республика Крым выбраны для проведения исследований?

5. Непонятно, почему в схеме опыта в разделе 2.2.3.1 и таблице 2.3 при выделении бактериальных культур на выбор среды для культивирования, объем анализируемого образца, повторность, время культивирования влиял регион, с которого были взяты в исследование зараженные растения? Получается, что для бактерий, выделенных в Московском регионе, нужно использовать среду CRL, а для бактерий из Крыма – YDC?

6. В заключении отмечено, что «идентифицированные изоляты бактерий позволили сформировать коллекцию патогенных и непатогенных бактерий, выделенных из зерновых культур». Но в диссертации ни по одной из выделенных бактерий не представлены результаты изучения их патогенности.

7. В целом, исследователем проведен очень большой объем исследований: три анализируемые зоны, широкий спектр исследуемых зерновых культур в каждой из зон, масштабное исследование компонентов культивируемой бактериальной микробиоты зерновых культур, в том числе в зависимости от предшественника. Но тем не менее хотелось бы увидеть в работе более глубокий анализ. Например, из огромного списка выявленных бактерий - какие обнаружены впервые на зерновых культурах в России? Может быть, более подробно изучить патогенные, биологические, морфологические свойства впервые выделенной в Республике Крым бактерии *Xanthomonas translucens*.

Заключение.

Диссертация Мувинги Муфаро «Development and optimization of methods for the detection and identification of bacterioses that are significant to the export and import of Russian grain products / Разработка и оптимизация методов выявления и идентификации бактериозов, значимых для экспорта и импорта Российской зернопродукции» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи быстрой и точной идентификации бактериальных фитопатогенов зерновых культур, что найдет широкое применение в области фитосанитарного регулирования и карантина растений. Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук, согласно п. 2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», утвержденного ученым советом РУДН, протокол № УС-1 от 22.01.2024 г., а ее автор, Мувинги Муфаро, заслуживает присуждения ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.3. Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений.

Отзыв на диссертацию и автореферат обсужден на заседании лаборатории молекулярно-иммунологических исследований ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства» (протокол № 5 от «19» августа 2024 года).

Заведующий лабораторией
молекулярно-иммунологических
исследований,
кандидат сельскохозяйственных наук
(06.01.05 – Селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений,
06.01.06 – Овощеводство)

Ирина Александровна
Енгальчева

Подписи директора ФГБНУ ФНЦО, д.с.-х.н., академика РАН А.В. Солдатенко, зав. лабораторией молекулярно-иммунологических исследований, к.с.-х.н. И.А. Енгальчевой удостоверяю:

Начальник отдела кадров



Высоцкая О.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр овощеводства»

Адрес: 143080, Московская область, Одинцовский городской округ, поселок
ВНИИССОК, ул. Селекционная, д. 14.

Телефон: +7 (495) 599-24-42

E-mail: priemnaya@vniissok.ru