УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ ВИЗР
Кандидат биологических наук
Ганнибал Филипп Борисович
16.03.2020

ОТЗЫВ

Ведущего учреждения на диссертационную работу
Чижик Веры Константиновны
на тему «SSCP-анализ генов вирулентности возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans»,* представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы. Фитофтороз картофеля является серьезным заболеванием, приносящим существенные убытки сельскому хозяйству. Химический метод защиты от возбудителя *Phytophthora infestans* эффективен, но несет много рисков и значительно ухудшает экологическую ситуацию в агроценозах. Селекция сортов картофеля на устойчивость к патогенам - наиболее эффективный, экономически и экологически оправданный подход в решении данной проблемы. Однако известно, что возбудитель фитофтороза обладает очень высокой скоростью изменчивости и преодолевает устойчивость картофеля, обусловленную главными генами очень быстро, в течение 2-х или 3-х сезонов. Для разработки методов генетической защиты сортов необходимы знания о молекулярных механизмах взаимодействия возбудителя и растения-хозяина, механизмах возникновения новых агрессивных рас патогена. В связи с этим исследования Чижик Веры Константиновны, направленные на выявление полиморфизма *Avr* генов на уровне нуклеотидных последовательностей являются актуальными. В. К. Чижик подошла к этой проблеме, основываясь на

современных знаниях о структуре генов авирулентности, полученных в результате геномного анализа, обширной информации, представленной в базах данных.

Научная новизна результатов исследований, результатов и выводов.

Новизна проведенных исследований состоит в том, что впервые в мире SSCP-анализ был успешно использован как метод различения изолятов P. infestans. Диссертантом доказано, что SSCP-анализ Avr генов обладает хорошей воспроизводимостью и высоким разрешением. На большом экспериментальном материале показано, что этот метод эффективно выявляет редкие варианты Avr генов. Впервые получены данные по полиморфизму генов Avr P. infestans на территории Российской Федерации и проведен анализ связи с составом генов устойчивости к фитофторозу у сложных межвидовых гибридов картофеля.

Научная и практическая значимость результатов и основных положений, выносимых на защиту.

Работа имеет теоретическое значение для понимания структуры генов авирулентности возбудителя фитофтороза, аллельного полиморфизма, типах возникающих мутаций и их потенциальной роли в возникновении новых аллельных вариантов, которые могут экспрессировать белки эффекторы, распознаваемые растением-хозяином.

Полученные результаты можно использовать для мониторинга популяций P. infestans и выявления пула скрытой генетической изменчивости аллельного разнообразия генов авирулентности, что является основой для разработки новой методологии изучения механизмов адаптивной эволюции патогена.

Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы. Результаты диссертационной работы могут быть использованы в научно-исследовательских учреждениях биологического профиля, выполняющих прикладные и фундаментальные исследования взаимоотношений между паразитом и хозяином. Кроме того, разработанные в ходе диссертационного исследования протоколы и полученные

экспериментальные данные могут быть рекомендованы при чтении лекционных спецкурсов по генетике и биотехнологии микроорганизмов, а также при проведении лабораторно-практических занятий.

Структура и содержание диссертационной работы.

Диссертационная работа посвящена идентификации и структурной характеристике Avr генов P.infestans – возбудителя фитофтороза картофеля. Целью исследования являлась разработка простого и надежного биотехнологического метода различения линий *P. infestans*, основанного на полиморфизме *Avr* генов на уровне нуклеотидных последовательностей на основе анализа конформационного полиморфизма одноцепочечных молекул ДНК (SSCP,Single-Strand Conformation Polymorphism).

Задачи диссертационной работы адекватны поставленной цели и посвящены изучению полиморфизма Avr генов, с использованием не применявшегося ранее для этих целей молекулярного метода SSCP.
В настоящей работе выбор метода SSCP, аргументирован его преимуществами по сравнению с другими известными молекулярными методами генотипирования в обнаружении редких и скрытых в гетерозиготном состоянии мутационных изменений в одиночных нитях ДНК, которые являются аллелями исследуемого гена. SSCP-анализ впервые в мире был использован диссертантом для различения изолятов *P.infestans*.

Диссертация имеет традиционную структуру, изложена на 158 страницах, включает 5 глав, 16 таблиц, 27 рисунков, список цитируемых работ состоит из 190 публикаций.

Представлен обзор на 47 страницах, в котором четко изложены современные представления об иммунитете растений к болезням, детально рассмотрены функции, структура и механизмы изменчивости генов вирулентности *P. infestans* (правильнее их называть генами авирулентности) и генов устойчивости картофеля, а также молекулярные подходы для

изучения генетического разнообразия изолятов возбудителя. Очевидно, что автор прекрасно разбирается во всех перечисленных проблемах, владеет современной информацией и, конечно, обзор может быть опубликован в научном издании. Возможно, в обзоре не хватает информации о связи выявляемых в результате SSCP анализа аллельных вариантов Avr -генов с вирулентностью изолятов. Автор обосновывает в обзоре необходимость и возможность использования для выполнения цели диссертационной работы именно метода SSCP.

Материалом исследования служили две группы изолятов (23+16) из Московской и Ленинградской областей, которые были охарактеризованы по наличию в них известных генов авирулентности и полиморфизму этих генов, выявленному методом SSCP. Всего проанализированы 11 Avr генов, для которых выявлены от двух до шести SSCP паттернов, пригодных для различения линий *P. infestans*.

Метод позволяет выявить мутации в каждой из нитей ДНК искомого гена, которые отличают доминантные аллели авирулентности от рецессивных аллелей вирулентности конкретных генов, кроме того, число выявляемых зон дает информацию о плоидности изолята.

Нуклеотидные последовательности ДНК из отдельных зон SSCP паттернов были сопоставлены с последовательностями *Avr* генов, доступными в базе данных NCBI, новые последовательности были зарегистрированы. В большинстве случаев отдельные зоны соответствовали рецессивным аллелям *Avr* генов, ответственным за вирулентность. Однако для *Avr-blb1* найдены преимущественно варианты гена, связанные с авирулентностью.

<u>Оценка оформления работы.</u>

В целом, диссертационная работа Чижик Веры Константиновны написана хорошим литературным языком. Работа оформлена в соответствии с ГОСТ. Обзор литературы подчинен общей логике исследовательской работы. Диссертация иллюстрирована таблицами и рисунками. Проведенная автором

статистическая обработка и использование биоинформатического анализа позволяет оценить достоверность интерпретации полученных результатов. Представленные выводы соответствуют полученным результатам.

Вопросы, замечания и недостатки диссертационной работы. Произвольное использование терминов: термин «маркеры» часто заменяется на «дескрипторы», «состав генов» на «профиль генов»; неприемлимо использовать сочетание «вирулентная форма гена» (вероятно, можно было ввести такой , условный термин, взяв его в кавычки).

Первое положение в диссертации сформулировано не совсем верно во второй своей части: «SSCP паттерны являются надежными маркерами полиморфизма *Avr* генов, пригодными для различения линий *P. infestans* и своевременного обнаружения новых патотипов *P. infestans*». В данном случае нужны пояснения о корреляции SSCP паттернов и патотипов возбудителя. (Почему «линии» патогена, а не штаммы? «Линии» обычно употребляют для растений).

Как правильно указывает диссертант, «SSCP-анализ, как и все методы, основанные на ПЦР, позволяет оценить только структурный полиморфизм гена, но не его функциональные особенности», вследствие этого вызывает сомнение правомочность вывода о том, что «использование методов молекулярно-генетического анализа *Avr* генов для раннего обнаружения новых штаммов *P. infestans* и их характеристики позволит прогнозировать возможные потери урожая. Полученную информацию можно будет использовать для характеристики вирулентности изучаемых штаммов *P. infestans*, что в свою очередь позволит давать прогноз повреждающей способности этих штаммов, если известны гены устойчивости к фитофторозу у сортов картофеля, выращиваемых в этих агроценозах».

Полиморфизм гена по аллельному составу не означает обнаружения новых патотипов, а свидетельствует о потенциальной возможности конкретного аллеля в будущем заменить другие аллели в данном гене в результате рекомбинационных событий при половом и, возможно, бесполом

размножении и сделать ген гомозиготным по данной аллели. Вот тогда, возможно, продукт этого гена повлияет на патогенность изолята.

На данный момент нет экспериментальных данных о связи между наличием отдельных аллелей Avr генов и вирулентностью изолятов и поэтому, по-видимому, пока рано делать выводы, о том, что: «Новые данные о полиморфизме *Avr* генов способствуют изучению эволюции генома *P. infestans* и могут быть использованы селекционерами для определения методом эффекторомики соответствующих генов устойчивости, на которых строится современная селекция картофеля».

Вызывает недоумение утверждение диссертанта, что «При определении состава генов вирулентности на растениях-дифференциаторах, номер расы означает отсутствие авирулентной формы гена. Вирулентная форма не определяется с помощью этих дифференциаторов», как раз «вирулентная форма» определяется с помощью дифференциаторов, так как номер расы свидетельствует о наличии факторов вирулентности к каждому из 11 дифференциаторов.

На стр.85 «Таким образом, авирулентные и вирулентные варианты генов могут находиться в разных локусах» - следовало бы объяснить, как автор понимает это утверждение?

На стр.120 «Технология выявления полиморфизма при помощи SSCP метода позволяет типировать линии *P. infestans* с предсказанием их вирулентности» Объясните, каким представляется алгоритм предсказания, если аллели вирулентности выявляются в гетерозиготе.

Указанные замечания не снижают значимости полученных результатов по молекулярной характеристике генов авирулентности возбудителя *P. infestans*, а лишь подчеркивают потенциальные возможности расширения исследований в области определения возможной связи полиморфизма генов авирулентности *P. infestans* с фенотипическими признаками адаптации патогена.

Заключение

Диссертационная работа Чижик Веры Константиновны на тему «SSCP-анализ генов вирулентности возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans*», является квалификационной научно-исследовательской работой. В диссертации использованы современные молекулярно-генетические методы, адекватные поставленной цели и задачам исследования. Полученные экспериментальные данные обладают научной новизной, а также представляют как практическую, так и фундаментальную ценность. Выводы достоверны и обоснованы. Основные результаты и выводы исследований по диссертационной работе Чижик В.К. опубликованы в 3-х рецензируемых журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных ВАК РФ. Результаты исследований апробированы на всероссийских и международных симпозиумах и научных конференциях. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам, выводам и положениям, выносимым на защиту.

Исходя из вышеизложенного, диссертационная работа «SSCP-анализ генов вирулентности возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans*» по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, а ее автор, Чижик Вера Константиновна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв обсужден на заседании лаборатории иммунитета растений к болезням Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР) 16. 03. 2020, протокол № 3.

Отзыв подготовили:

Афанасенко Ольга Сильвестровна,
доктор биологических наук по специальности
06.01.07 – Защита растений, профессор, академик
РАН, заведующий лабораторией иммунитета
растений к болезням.

Нина Васильевна Мироненко,
доктор биологических наук
по специальности 03.02.07 – генетика и 03.02.12
- микология, ведущий научный сотрудник
лаборатории иммунитета растений к болезням

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»
(ФГБНУ ВИЗР)
Адрес: Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, д. 3, 196608
Тел. +7 (812) 470-51-10
E-mail: info@vizr.spb.ru
Сайт: vizrspb.ru

ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Всероссийский научно-исследовательский
институт защиты растений »,
кандидат биологических наук

Наталья Александровна Белякова

«16» марта 2020 г.