

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертационную работу Чижик Веры Константиновны
**«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. Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является важнейшей, после зерновых, продовольственной культурой и занимает четвёртое место в мире по площади возделывания. Фитофтороз, возбудителем (*Phytophtora infestans* (Mont.) de Bary) - одно из экономически наиболее важных заболеваний картофеля. В РФ практически нет сортов картофеля с высокой устойчивостью к этому патогену. Успешная борьба с фитофторозом не может вестись только химическими методами защиты картофеля, так как пестициды теряют свою эффективность в результате накопления в популяциях патогена резистентных штаммов.

Для создания сортов картофеля с высокой и долговременной устойчивостью к фитофторозу и оптимизации применения пестицидов необходимы знания о взаимодействии полигенной системы защиты растения (*R* гены) с детерминантами патогенности *P. infestans*, к которым относятся гены вирулентности (*Avr* гены).

Информация о полиморфизме *Avr* генов и их взаимодействии с *R* генами должна быть использована в селекции картофеля и для поиска новых генов устойчивости методом эффекторомики. В связи с вышеизложенным, актуальность представленной диссертационной работы не вызывает сомнения.

Научная новизна результатов исследований, результатов и выводов.
Известно использование растений-дифференциаторов, генетических маркеров и оценка устойчивости к металаксилу при изучении состава популяций *P. infestans* на территории Российской Федерации. Распространение некоторых *Avr* генов проанализировано на территориях, соседних с РФ, однако на территории Российской Федерации состав *Avr* генов ранее не исследовали. Это делает представленное молекулярно-генетическое исследование *Avr* генов у штаммов *P. infestans*, колонизующих посадки картофеля в РФ уникальным исследованием в нашей стране. З. Среди *Avr* генов *P. infestans*, относящихся к семейству RXLR эффекторов, в изученной коллекции были обнаружены полиморфные *Avr1*, *Avr2*, *Avr2-like*, *Avr3a*, *Avr9*, *Avr-blb1*, *Avr-blb2* и *Avr-vnt1*, и консервативные гены *Avr3b*, *Avr4* и *Avr8*. Для всех этих генов, за исключением *Avr4* и *Avr8*, были выявлены новые аллели, характерные для Европейской части России. В линиях *P. infestans*, которые колонизуют устойчивые к фитофторозу межвидовые гибриды картофеля из генетической коллекции ВИР, преобладали вирулентные варианты *Avr* генов, в то время как неустойчивые сорта колонизировались линией патогена, в

которой преобладают авибулентные варианты этих генов. Высокоаггрессивные линии 6_A1 и 13_A2, по данным SSCP анализа, отличаются наименьшим числом Avr генов, однако, в их геноме присутствуют гены вирулентности Avr-blb1, Avr-blb2 и Avr-vnt1, которые позволяют преодолевать устойчивость большинства сортов картофеля.

Научная и практическая значимость результатов и основных положений, выносимых на защиту. Результаты диссертационной работы Чижик В.К. имеют теоретическое и прикладное значение, а именно в разработке методики оценки состава Avr генов и их распределения в популяции патогена. Цель работы – создать на основе метода Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) анализа простую и надежную технологию определения состава Avr генов в линиях *P. infestans*, колонизирующих сорта и гибриды картофеля, полностью выполнена. Поставленные задачи решены:

- оптимизированы условия ПЦР для амплификации Avr генов *P. infestans*;
- клонированы Avr гены для определения их последовательности и проведено сравнение с ранее охарактеризованными последовательностями тех же генов;
- валидирован метод SSCP анализа как воспроизводимый метод определения полиморфизма Avr генов
- исследованы изоляты *P. infestans*, собранные на Европейской территории России, и проведен биоинформационный анализ полученных данных;
- сопоставлен состав Avr генов у штаммов *P. infestans* с профилями генов устойчивости у колонизированных этими штаммами растений картофеля

Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы. Результаты диссертационной работы могут быть использованы в научно-исследовательских учреждениях биологического профиля, выполняющих прикладные и фундаментальные исследования по эпидемиологии фитофтороза картофеля и селекции устойчивых сортов этой культуры. Кроме того, разработанные в ходе диссертационного исследования протоколы и полученные экспериментальные данные могут быть рекомендованы при чтении лекционных спецкурсов по фитопатологии и селекции растений, а также при проведении лабораторно-практических занятий.

Структура и содержание диссертационной работы. Диссертационная работа Чижик В.К. написана по традиционному плану и состоит Введения, глав «Обзор литературы», «Методы исследования», «Результаты и обсуждение», Заключения, Выводов и списка цитируемой литературы.

Во введении к диссертационной работе автор раскрывает актуальность темы исследования, формулирует цель и соответствующие задачи исследования. Также, указаны новизна, теоретическая и практическая значимость работы, определена методология и методы диссертационного исследования, а также положения, выносимые на защиту. Во Введении отмечены степень достоверности и апробация работы, а также личный вклад автора в проведенные исследования. В заключение раздела «Введение» автор

отмечает соответствие диссертации паспорту научной специальности, а также приводит информацию о публикациях в рецензируемых научных изданиях.

В главе «Обзор литературы» дается анализ новейшей отечественной и зарубежной научной литературы, характеризующий биологию и систематику возбудителя фитофтороза и растения-хозяина картофеля. Описаны взаимодействие патоген – растение-хозяин на молекуларно-генетическом уровне, дана информация о генах вирулентности *P. infestans* и генах устойчивости картофеля. В Главе «Методы исследования» приведены данные о материале для исследования, методах выделения линий патогена и определения их вирулентности, выделения ДНК и проведения ПЦР анализа и секвенирования ДНК. В ходе данной работы был валидирован метод SSCP анализа и разработан протокол, подходящий для эффективного обнаружения полиморфизма генов вирулентности. В Главе «Результаты и обсуждение» приведены результаты работы и сравнение их с ранее опубликованными данными, проведен анализ полученных данных.

Описаны оптимизация условий ПЦР и валидирование метода SSCP анализа для быстрого скрининга генов вирулентности *P. infestans*, изучен «репертуар» генов вирулентности у штаммов *P. infestans*, колонизующих растения картофеля в этой коллекции.

Завершают основную часть диссертационной работы заключение по экспериментальной части, а также выводы.

Раздел «Список литературы» включает 190 источников, из которых 179 на английском языке.

Оценка оформления работы. В целом, диссертационная работа Чижик В.К. написана в хорошем научном стиле, содержит незначительное количество стилистических, орфографических, пунктуационных ошибок. Диссертационная работа оформлена в соответствии с ГОСТ. Обзор литературы соответствует плану исследовательской работы.

Проведенные экспериментальные исследования базируются на основе литературных данных, а также полностью соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Кроме того, работа хорошо иллюстрирована. Экспериментальные данные логичны, последовательны, методически корректны. Проведенная автором статистическая обработка результатов экспериментов, а также иллюстративный материал позволяет оценить достоверность и правильность интерпретации полученных результатов. Представленные в тесте диссертации и автореферате выводы достоверны.

Вопросы, замечания и недостатки диссертационной работы. Высоко оценивая диссертационную работу Чижик В.К., следует остановиться на некоторых вопросах, которые возникли при ознакомлении:

- 1) На стр. 16. (Обзор литературы) Автор приводит определение «Эффекторы – это молекулы, продуцируемые и секретируемые патогенами для подавления защитных реакций растения (Raffaele and Kamoun, 2012).»

Согласно другому определению» Effectors are pathogen proteins involved in disease development. The pathogen uses them to infect and cause disease.» Halterman, Dennis A. 2017. Demonstrating concepts of pathogenesis using effectors of *Phytophthora infestans*. The Plant Health Instructor. 10.1094/PHI-T-2017-0610-01 – «Эффекторы – белки патогена, которые вовлечены в развитие болезни. Патоген использует их для заражения и причинения болезни», это определение представляется более точным, поскольку ключает и функцию взаимодействия с т.н. «генами восприимчивости» растения.

- 2) На стр. 16 , ниже «Бактерии обладают множественными системами секреции, которые облегчают секрецию эффекторов. Наиболее изученным секреторным путем грамотрицательных бактерий является система секреции третьего типа (T3SS), которая доставляет эффекторы в клетку и играет роль в патогенезе. Нематодные эффекторы могут непосредственно секретироваться в клетки из стилета или доставляться в апопласт растения за счет подкожной секреции. Насекомые, такие как тля, также могут доставлять эффекторы с помощью стилета.»

Сходство терминов не означает структурного или функционального сходства эффекторов оомицетов, бактерий, нематод и насекомых. Необходимо было отразить этот факт.

- 3) На стр. 22 приводиться описание систематического положения оомицетов, иллюстрированное рис. 2. (Рисунок 2. Филогенетическое древо эукариотов (по Raffaele and Kamoun, 2012)) – «Таким образом, таксономически оомицеты ближе к бурым (*Phaeophyta*) и диатомовым (*Bacillariophyta*) водорослям, чем к настоящим грибам. В связи с этим, они получили название «грибоподобные организмы», «псевдогрибы» или «микоиды». К ним относятся группа хромистов (*Chromista*) или страменопил (*Straminopila*).»

К сожалению, на самом рисунке не указаны те группы организмов, которые обсуждаются в тексте, что снижает ценность и рисунка и обсуждения.

- 4) На стр. 71-73 в главе 2.2. Методы исследования, и на стр. 79-81 (раздел 2.2.8 Реактивы для SSCP-анализа) приведена информация о методах выделения оомицетов из растительного материала, выделении ДНК, проведении SSCP-анализа.

Не ясно, являются ли они полностью оригинальными или модифицированными – приведены ссылки только на инструкции коммерческих наборов для выделения ДНК.

- 5) На стр. 95., Данные, приведенные в Таблице 13. Генотипы, выявленные в исследуемой популяции в зависимости от полиморфизма гена *Avr2*, и их встречаемость в изученных образцах, вызывают вопрос о соответствии заголовка таблицы и ее содержании. Например, Генотип 4 имеет два столбца - *Avr2* и *Avr2-like*, два нижних столбца с подписями K/N и MI/TV, и только одно значение в рядах Кол-во образцов и % образцов. Смысл такого оформления таблицы не понятен.

- 6) На стр. 119, приведено предложение «В тоже время, в этих двух линиях *P. infestans* были обнаружены такие гены, как *Avr-blb2* и *Avr-vnt1*, распознающие гены устойчивости которых практически отсутствуют в сортах картофеля. Эти данные могут объяснить, почему 13_A2 и 6_A1 поражают многие сорта картофеля и стали причиной серьезных эпидемий фитофтороза в Северо-Западной Европе, Китае и Индии (Cooke et al., 2012; Li et al., 2013; Dey et al., 2018).»

Не ясно, как гены *Avr-blb2* и *Avr-vnt1* распознают отсутствующие в сортах картофеля гены устойчивости. Вероятно, автор имела ввиду, что гены *Avr-blb2* и *Avr-vnt1* распознаются генами устойчивости?

- 7) На стр. 127 (Заключение) «В нашей работе была предпринята попытка выявить структурные особенности некоторых генов оомицета *P. infestans*, обуславливающих его вредоносность по отношению к картофелю, и использовать эти данные для различения изолятов на основе полиморфизма этих генов.»

Такое определение умаляет выполненную работу. Работа выполнена, и получены ценные результаты, анализ которых может дать дополнительную информацию, ценную как для селекции устойчивых сортов, так и для разработки новых методов борьбы с фитофторозом картофеля.

Несмотря на представленные выше замечания и неточности, работа, в целом, оставляет хорошее впечатление. Экспериментальная часть выполнена на высоком научном и методическом уровнях. Отмеченные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают выводов и не умоляют значения представленной диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Чижик Веры Константиновны на тему «SSCP АНАЛИЗ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ФИТОФТОРОЗА *PHYTOPHTHORA INFESTANS*», является квалификационной научно-исследовательской работой. В диссертации использованы классические 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 19 печатных работах, 4 из которых представлены в журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных ВАК РФ. Результаты исследований апробированы на 9 всероссийских и международных симпозиумах или 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).

Заместитель генерального директора ООО «Исследовательский Центр «ФитоИнженерия», доктор биологических наук



Игнатов Александр Николаевич

Адрес:

Россия, 141880, Московская обл., Дмитровский р-н,
с. Рогачево, ул. Московская, стр. 58. К. 8.

Тел.: +7 (926) 197-36-00

e-mail: an.ignatov@gmail.com

Подпись доктора биологических наук Игнатова А.Н.
«УДОСТОВЕРЯЮ»

Менеджер по кадрам

ООО «Исследовательский Центр «ФитоИнженерия»



Лосева Юлия Александровна

«15» марта 2020 г.