

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Чижик Веры Константиновны
«SSCP-анализ генов вирулентности возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans*»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнология)

Актуальность исследований. Фитофтороз картофеля, вызываемый оомицетом *Phytophthora infestans*, является одним из наиболее важных заболеваний картофеля. Прямые и сопутствующие глобальные экономические потери, связанные с этим патогеном, достигают нескольких миллиардов евро в год. Поскольку картофель относится к стратегическим сельскохозяйственным культурам, фитофтороз представляет собой значительную угрозу продовольственной безопасности населения. В связи с этим исследования, связанные с контролем данного патогена, включая типирование и оценку его потенциальной вредоносности, имеют огромное практическое значение, в частности, в сфере прогнозирования рисков, контроля распространения наиболее вредоносных штаммов и создания перспективных высокоустойчивых сортов картофеля.

Технологии типирования штаммов *P. infestans*, применяемые в настоящее время для оценки их потенциальной вредоносности, основаны на трудоемких и занимающих довольно много времени фитопатологических методах. В то же время молекулярно-биологические методы генотипирования, такие как анализ гаплотипов митохондриальной ДНК, RFLP и SSR, основаны на применении ДНК-маркеров полиморфных участков генома, никак не связанных с вредоносностью патогена. Таким образом, применяемые в настоящее время методики молекулярного анализа обеспечивают возможность проведения фундаментальных исследований в области эволюционных изменений и путей миграций штаммов патогена, но малополезны в важных прикладных аспектах, связанных с созданием устойчивых сортов картофеля, прогнозированием рисков и минимизацией связанных с фитофторозом потерь урожая.

Актуальность исследования заключается в том, что предложенный автором метод типирования, основанный на анализе участков генома *P. infestans*, напрямую связанных с его вирulenceстью (гены вирulence), позволяет получать информацию о патотипах *P. infestans*, их потенциальной вредоносности по отношению к используемым сортам картофеля, а также предсказывать возможные потери урожая и корректировать выбор сортов для культивирования с целью минимизации таких потерь.

Определенная соискателем цель исследований заключается в создании на основе SSCP-анализа (анализ полиморфизма конформаций одноцепочечной ДНК) простого и надежного метода генотипирования штаммов *P. infestans*, основанного на полиморфизме *Avr* генов вирulence.

Научная новизна исследований. В настоящее время типирование штаммов *P. infestans* по их вирulence традиционно проводится фитопатологическим методом с использованием набора растений-дифференциаторов Блэка. В данном исследовании автор впервые в мире использовал SSCP-анализ как метод для различия штаммов *P. infestans* и продемонстрировал их эффективность для выявления редких вариантов *Avr* генов. Несмотря на то, что в последние годы идентификация и характеристика *Avr* генов патогена является одной из активно развивающихся областей исследования за рубежом, распространение этих генов на территории России ранее не исследовали. Следовательно, полученные автором данные по присутствию и распространению этих генов в стране, а также их полиморфизму являются новыми. Наконец, в ходе диссертационного исследования были впервые выявлены и охарактеризованы 52 новые, ранее неизвестные вариации последовательности *Avr* генов, а также новые аллелы для 9 этих генов.

Практическая значимость работы. Разработанная автором система генотипирования штаммов патогена на основе полиморфизма *Avr* генов позволяет различать штаммы по участкам генома, прямо связанных с уровнем его вредоносности, что, в свою очередь, обеспечивает возможность более точной оценки риска потерь урожая, а также минимизации возможных будущих потерь путем выбора для посадки сортов картофеля с генами устойчивости, не соответствующими генам вирulence, представленным в локальной популяции патогена. Кроме того, полученные автором результаты могут быть использованы для мониторинга популяций *P. infestans*, а также в селекции фитофтороустойчивых сортов картофеля.

В ходе диссертационного исследования, автор выполнил ряд сложных и трудоемких задач с привлечением различных молекулярно-биологических методов анализа. Были подобраны (частью на основе литературных данных, частью самостоятельно) последовательности праймеров для 11 наиболее важных *Avr* генов и оптимизированы условия полимеразной цепной реакции для них. Был разработан и валиден метод SSCP-анализа генов вирulence *P. infestans*. Применение

разработанной методики для анализа 36 образцов чистых культур патогена, выделенных в Ленинградской и Московской области, 7 референтных зарубежных линий, а также 38 полевых образцов позволило определить SSCP-паттерны *Avr*-генов с выявлением степени их полиморфизма, оценить частоты встречаемости обнаруженных SSCP-паттернов в изученных выборках образцов и степень их полиморфизма. На основании полученных данных, был выполнен филогенетический анализ *Avr* генов в выборках, продемонстрировавший высокий уровень соответствия полученных кластеров с географическим происхождением штаммов, а также удовлетворительное соответствие результатам анализа этих же штаммов методом SSR. Было выполнено сопоставление данных, полученных методом SSCP-анализа, с данными фитопатологического типирования образцов *P. infestans* на наборе растений-дифференциаторов. Наконец, SSCP-анализ включенных в исследование образцов позволил выявить новые, ранее неизвестные последовательности *Avr* генов, и включить их в международную генетическую базу данных Genebank NCBI.

Работа отличается значительным уровнем новизны и высоким потенциалом практической применимости; с методической точки зрения выполнена на хорошем современном уровне. Все полученные в исследовании результаты были надлежащим образом статистически обработаны и являются достоверными. Выводы соответствуют проведенным исследованиям.

Результаты исследования были опубликованы в 4 статьях в журналах, входящих в перечень ВАК, а также представлены в форме 15 тезисов и статей в сборниках материалов профильных российских и зарубежных конференций.

В целом, работа В.К. Чижик представляет существенный научный и практический интерес как для специалистов, занимающихся селекцией и защитой картофеля, так и для специалистов, работающих в области исследования и мониторинга популяций *P. infestans*, а ее результаты в перспективе будут высоко востребованы на практике. Исследование отвечает квалификационным требованиям ВАК РФ, а его автор Чижик Вера Константиновна безусловно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе нанобиотехнологии).

Старший научный сотрудник
Отдела болезней картофеля и овощных культур
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский
Институт фитопатологии», кандидат биол. наук

Н.В. Стасюк

Подпись Н.В. Стасюк заверяю.

Зам. директора по кадрам
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский
Институт фитопатологии»



Д.В. Кузина

Адрес ВНИИФ: 143080, Московская обл., Большие Вяземы, ул. Институт, вл. 5.
Тел. 8(495) 597-42-28, факс 8(498) 694-11-24; email: vniif@vniif.ru