

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

**Кандидата биологических наук Пименова Сергея Викторовича на диссертационную работу Насерзаде Юсефа «Молекулярная идентификация и дизайн специфических праймеров для карантинных и некарантинных видов плодовых мушек (*Drosophila suzukii*, *Drosophila simulans*, *Drosophila melonogaster*)», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.3 Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений.**

**Актуальность темы.** Большую часть рациона людей во всем мире составляют овощи и фрукты, которые относятся к скоропортящимся продуктам питания. Товарооборот имеет сезонный характер, так как северное полушарие ограничено в зимний период в выращивании указанной выше продукции. Ее качество заключается не только в безопасности со стороны содержания остаточных веществ от применения пестицидов, но и отсутствия в ней вредителей, которые портят товарный вид и качество. Если присутствие фитопатогенов влияет на продуктивность, внешний вид и питательность фруктов, ягод и овощей, то наличие в них насекомых ограничивает их сроки реализации и в целом возможность продажи. Основными вредителями такой продукции являются плодовые мухи, среди которых есть ряд карантинных и особо опасных представителей семейства Tephritidae. Фитосанитарный контроль должен заключаться не только в отсутствии карантинных видов вредных насекомых, но и в других, в том числе, близкородственных видов плодовых мух. Не всегда необходимые процедуры, такие как обеззараживание, могут лишать жизнеспособности вредителей внутри плодов и ограничивать экономический ущерб при развитии и размножении мушек.

Для осуществления фитосанитарного контроля при ввозе плодоовощной продукции необходимо своевременно выявлять и идентифицировать в первую очередь, отсутствующие на территории страны вредные организмы, а во вторую очередь – оповестить импортера и экспортера о присутствии в плодах преимагинальных стадий других видов Tephritidae.

В настоящее время идентификация многих насекомых заключается в морфометрических определениях, и видовая диагностика возможна только по взрослым особям. При этом продукция содержит личинки разных возрастов и зачастую необходимо ждать (доразвивать) имаго для точного определения вида плодовых мух рода *Drosophila*. Применение молекулярно-генетических методов позволило бы ускорить этот процесс, который занимает достаточно ограниченное время для анализа. На сегодняшний момент для плодовых мушек, в частности для

вида *Drosophila suzukii*, в мировой практике имеются подходы с применением универсальных участков генов насекомых с последующим секвенированием.

**Степень разработанности темы** основывается на литературных источниках и базах данных по изучению морфологических и генетических особенностей плодовых мух различной родовой принадлежности, а также возможных приемов молекулярно-генетического анализа в рутинной диагностике.

**Целью диссертационной работы** является поиск способа быстрого выявления и идентификации опасного вида *Drosophila suzukii*, а также усовершенствование методов идентификации близкородственных видов: *Drosophila simulans* и *Drosophila melanogaster*, которые чаще всего встречаются в плодоовощной продукции. Поставленные автором **задачи** позволили автору получить результаты, отличающиеся практической значимостью и научной новизной.

**Научная новизна проведенных исследований** заключается в том, что были разработаны видоспецифичные тесты (праймеры) для видовой идентификации близкородственных видов, чье применение на практике позволит с точностью до 100% выявлять карантинный вид плодовой мухи.

Проведен филогенетический анализ видов рода *Drosophila* для поиска мишеней в СОГена, который достаточно консервативен у насекомых. Получены филогенетические деревья сродства видов плодовых мух относительно географического происхождения.

Впервые предложены видоспецифичные молекулярные тесты, которые можно применять в рутинной диагностике на территории Российской Федерации и Ирана. Оценены специфичность и воспроизводимость предлагаемых молекулярных мишеней. Результаты исследования внедрены в работу специализированных лабораторий Ирана.

**Теоретическая и практическая значимость результатов исследований** состоит в разработке новых специфичных праймеров для экспресс-диагностики карантинных и некарантинных видов *Drosophila* sp. Для молекулярной идентификации *D. suzukii*, разработаны три пары праймеров для классической ПЦР и для ПЦР в реальном времени - одна пара праймеров и зонд. Для молекулярной идентификации *D. melanogaster* были разработаны две пары праймеров для классической ПЦР и пара праймеров и зонд для ПЦР в реальном времени. Для молекулярной идентификации *D. simulans* были разработаны пара праймеров для классической ПЦР и пара праймеров и зонд для ПЦР в реальном времени.

**Степень достоверности и обоснованности результатов исследований** подтверждается методами работы с генетическими последовательностями, а

также положительными результатами апробации молекулярных мишеней для видовой идентификации целевых объектов.

По результатам диссертационного исследования опубликовано 7 статей, в том числе 2 – в научных журналах, включенных в базу данных International Journal и 2 – в базах данных Scopus, 2 – в рецензируемых журналах, включенных в список ВАК, и 1 оригинальная научная статья, представленная на конференции.

**Соответствие диссертации и автореферата.** Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, выводов и библиографии, что соответствует требованиям. Материал изложен на 127 страницах, включает 79 таблиц, 52 рисунков. Список литературы включает 84 источник. Автореферат изложен на русском и английском языках.

### **Анализ содержания диссертации**

**Во введении** автором обоснована актуальность и научная новизна исследования, сформулированы цель и задачи, а также положения, выносимые на защиту. В этом же разделе представлены научная новизна работы, ее практическая и теоретическая значимость

**В первой главе** «Обзор литературы» представлены общие сведения о карантинных и некарантинных видах плодовых мух рода *Drosophila* (*D. suzukii*, *D. simulans* и *D. melanogaster*). Представлена информация о существующих методах молекулярной диагностики и использовании разработанных праймеров для идентификационного анализа и сравнения разных видов. Проанализированы распространение и вредоносность *Drosophilasp.* в России и Иране. Также описаны таксономическое положение, информация о биологии, морфологических характеристиках, растения-хозяева, пути распространения, экономическое значение в товарообороте во всем мире.

**Во второй главе** «Материалы и методы» подробно описаны применяемые подходы молекулярно-генетического анализа вредных организмов: выделение из продукции, способы выделения ДНК, проверка ее качества, применяемые реактивы и оборудование. Описаны методы проведения ПЦР, секвенирования и филогенетического анализа и подбора видоспецифичных праймеров и зондов.

**В третьей главе** «Результаты и обсуждение» содержатся результаты по анализу доступного в исследовании материала, сравнении разработанных генетических мишеней, подробно указаны точки COI гена, где находятся группы видоспецифичных олигонуклеотидов. Описана дендрограмма сходства целевых объектов и близких к ним по географической принадлежности. Представлены результаты анализа специфичности новых праймерных систем и зондов.

В **Заключении** достаточно подробно проанализированы результаты настоящей работы. Сделанные автором выводы соответствуют поставленной цели и задачам, отражают суть проведенных исследований. В диссертации приведены подробные электрофореграммы, графики ПЦР в реальном времени. Таблицы исследуемых образцов и рисунки иллюстрируют каждый этап выполнения исследования.

Несмотря на достаточно большой объем исследований и подробный анализ данных по теме к автору возникли следующие вопросы и замечания:

- автор указывает в задачах изучение селективности и оценку применимости разработанных праймеров. Не совсем понятна разница и подходы в задачах, а также не описаны применяемые техники по определению селективности и оценке работоспособности тест-систем;

- работа в результативной части перегружена графиками и таблицами, описание которых является обсуждением результатов. Часть таблиц дублируют рисунки, описания к вышеуказанным нет;

- в работе указано внедрение в лабораторную практику в Иране, но по тексту работы существенной информации нет. Возможно, автору стоило сократить практическую значимость до апробации и возможного использования новых ПЦР-тестов в рутинной диагностике.

При этом возникшие в процессе изучения диссертации замечания не снижают научную и практическую значимость полученных результатов, их достоверность и актуальность и не влияют на положительную оценку работы.

### **Заключение**

Считаю, что представленная диссертационная работа Насерзаде Юсефа «Молекулярная идентификация и дизайн специфических праймеров для карантинных и некарантинных видов плодовых мушек (*Drosophila suzukii*, *Drosophila simulans*, *Drosophila melonogaster*)» является достаточно законченным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне. По актуальности исследований, теоретической и практической значимости работы, объему экспериментальных данных диссертация, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.3 Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений, является законченным исследованием с решенными задачами и выполненной целью.

Диссертация полностью соответствует требованиям п.2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов», утвержденного Ученым советом РУДН протокол № 12 от 23.09.2019г., а её автор Насерзаде Юсеф заслуживает присуждения ему

учёной степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.3  
Агротехника, агропочвоведение, защита и карантин растений.

**Официальный оппонент:**

Кандидат биологических  
наук (06.01.11. «Защита  
растений»)  
начальник отдела карантина  
растений, ФГБУ «Северо-  
Кавказская межрегиональная  
ветеринарная лаборатория»  
адрес: 355035, РФ  
Ставропольский край,  
город Ставрополь,  
Старомарьевское шоссе, 34  
Тел.:(8652) 28-16-53  
Тел./Факс:(8652) 28-17-56  
[pimenov1975@mail.ru](mailto:pimenov1975@mail.ru)

**Пименов  
Сергей  
Викторович**

*Подпись Пименова Сергея*

*Викторовича удостоверяю:*

И.о. директора ФГБУ  
«Северо-Кавказская  
межрегиональная  
ветеринарная лаборатория»



**Река Юрий  
Владимирович**