

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Кавиза Ньяша Джон «Анализ биологических свойств и совершенствование молекулярно-генетических методов диагностики фитопатогена *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4. 1. 3. Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений

Актуальность темы

Листовой ожог лука – вызываемый *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*, бактериальное заболевание, приводящее к задержке роста, ухудшению товарных качеств и снижению урожая культуры лука на 50%. Объект относится к карантинным видам и входит в список А1. Методы контроля ограничены. Имеются сведения об использовании препаратов, содержащих медь и этилен-бис-дитиокарбаматов, однако наличие генов резистентности у бактерий рода *Xanthomonas* ограничивает эффективность их применения.

Эффективный контроль заболевания возможен с использованием методов молекулярной диагностики (ПЦР). Наличие генетически гетерогенных штаммов *X. euvesicatoria* pv. *allii* подразумевает оптимизацию ПЦР анализа для диагностики данного патогена в различных растительных образцах: повышения чувствительности, специфичности, количественного определения патогена, быстроты анализа, сокращения времени на анализ результатов после амплификации.

Структура диссертации

Диссертация представлена на 136 страницах и состоит из введения, трех глав, заключения, списка литературы. Содержит 32 таблицы и 15 рисунков. Список литературы включает 149 источников.

Достоверность и новизна результатов диссертации

Результаты проведенных исследований достоверны. Выявлена корреляция между методами выделения и эффективностью последующего ПЦР-анализа, позволившее усовершенствовать ПЦР-анализ в результате определения оптимального метода экстракции ДНК. Кроме этого, выявлено влияние *X. euvesicatoria* pv. *allii* на энергию прорастания лука. Протестирован диагностический зонд BHQ (Black Hole Quencher) и предложен в качестве альтернативы зонду MGB (Minor Groove Binder, Applied Biosystems TaqMan, USA). Показано накопление бактериальной инфекции в верхней части луковицы

при изучении in-planta, а также влияние температуры на рост культуры *X. euvesicatoria* pv. *allii*.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Сформулированные в диссертации научные положения обоснованы и включают оптимизацию методов идентификации *X. euvesicatoria* pv. *allii* (подбор методов пробоподготовки, использование селективных питательных сред, выделения ДНК, ОТ-ПЦР с альтернативным зондом ВНQ), системы мультиплексной диагностики патогена методом ОТ-ПЦР рекомендуемой для анализа образцов лука, а также определения жизнеспособности и энергии прорастания семян лука зараженных *X. euvesicatoria* pv. *allii*.

Изложенная в разделах диссертации (результаты, обсуждение, заключение) информация и приведенные данные исследований четко сформулированы, обоснованы и соответствуют поставленным цели и задачам.

Ценность для науки и практики результатов работы

Протокол проведения ПЦР усовершенствован и оптимизирован для диагностики *X. euvesicatoria* pv. *allii*. Подтверждены такие показатели ПЦР-анализа, как чувствительность, специфичность, повторяемость и воспроизводимость. Оптимизация метода экстракции бактериальной ДНК значительно повысила эффективность ПЦР-анализа. Проведенные исследования позволили подобрать альтернативу зонду MGB и заменить его на зонд ВНQ. Полученные знания о биологии патогена позволят существенно улучшить идентификацию *X. euvesicatoria* pv. *allii*.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Опубликовано 7 статей, в том числе 6 в научных журналах индексируемых в базе данных SCOPUS, и 1 в журнале, включенном в Перечень ВАК РФ.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат соответствует основным положениям диссертации «Анализ биологических свойств и совершенствование молекулярно-генетических методов диагностики фитопатогена *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*».

Замечания по работе

Принципиальных замечаний к работе нет. Однако, первоначальная проверка приведенных в тексте источников литературы, на которых ссылается автор показала, что

большинство из них отсутствует в списке литературы. Например, нет в списке литературы Schwartz et al. (2003), EPPO (2020), Starr (1948), Murray & Holt (2005) и т.д. Также Gent et al. (2005a) нет в тексте, но есть в списке литературы, а Genta et al. (2005) наоборот приведен в тексте диссертации и т.д. Где-то фигурирует Robene, Robène, Robène-Soustrade, где-то только Soustrade (нет в списке), Robène et al. (2015) нет в тексте и т.д.

В тексте нет упоминания таблиц 1 и 2, но таблицы приводятся, это же относится и к рисункам 1 и 2. На странице 66 опечатка, т.к. автор отсылает к таблице 1 (распространение в мире), а необходимая информация содержится в таблице 12 (список видов).

На странице 35 приводится информация об оптимальной температуре от 28 до 35 °C для развития *X. euvesicatoria* pv. *allii*, однако в проведенных исследованиях автор выбирает нижнюю температурную границу, а не среднее значение (тем более указывается в тексте, что при этой температуре не происходил рост культуры), чем обоснован выбор? В 2.2.2. инкубация семян проходила при комнатной температуре, это сколько?

В главе 2 (Материалы и методы) при описании методик нет ссылок на протоколы исследований, либо нет приведенных протоколов в списке литературы, например, EPPO Standard PM 7/8 (4).

В таблицах 3, 4, 5 в графе Total Volume приведен итоговый объем 25 µl, однако при сложении строчек Components данное значение не получается.

На рисунках 14, 15 у графиков не подписаны оси абсцисс и ординат.

Ethylenebisdithiocarbamate (стр. 28) пишется через дефис ethylene-bis-dithiocarbamate или отдельно ethylene bis-dithiocarbamate fungicide. Tenfold (стр 36) пишется через дефис ten-fold.

В диссертации присутствуют опечатки, лишние знаки, не всегда нужный курсив и т.д.

Автор приводит информацию о покупке семенного материала для исследовательской работы: семена, сеянцы, саженцы, луковицы. Был ли проверен семенной материал до инокуляции *X. euvesicatoria* pv. *allii* на наличие этой и иной инфекции, преимущественно бактериальной, т.к. в латентной стадии могли присутствовать и повлиять на результаты анализа чужеродные патогены?

Указанные замечания не носят принципиального характера и не умаляют достоинств работы.

Заключение

Диссертационное исследование Кавиза Ньяша Джон является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи по кандидатской научной проблемы «Анализ биологических свойств и совершенствование молекулярно-генетических методов диагностики фитопатогена *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*», имеющей важное значение для науки и практики. Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, 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-12 от 03.07.2023г., а её автор, Кавиза Ньяша Джон, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4. 1. 3. Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений.

Официальный оппонент,

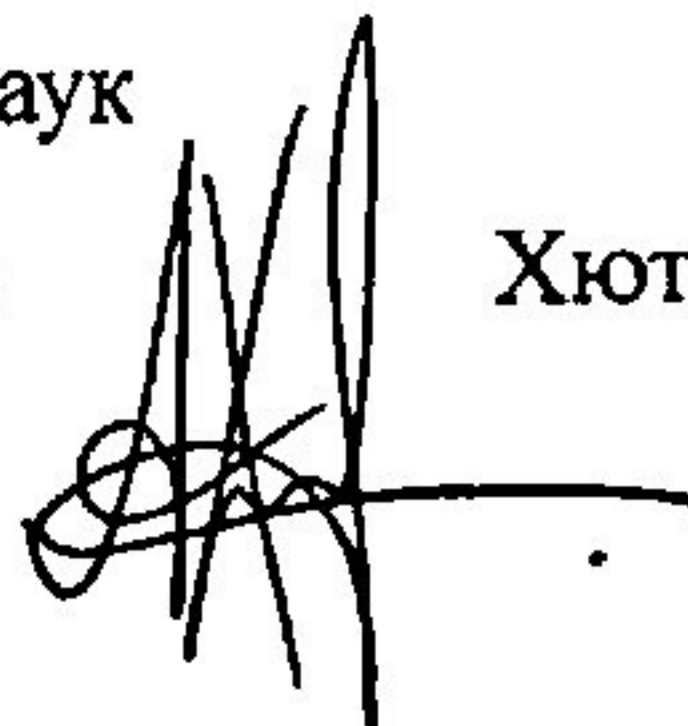
старший научный сотрудник

лаборатории иммунитета растений к болезням

ФГБНУ «ВИЗР», кандидат биологических наук

(специальность 06.01.11 – Защита растений)

Хютти Александр Валерьевич



Подпись Хютти Александра Валерьевича заверяю.

Секретарь
директора



Почтовый адрес: 196608, Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, д. 3

Телефон: +7 (812) 470-51-10, e-mail: info@vizr.spb.ru