

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора сельскохозяйственных наук, член-корреспондента РАН Упадышева Михаила Тарьевича на работу Разо Шиатесы «Разработка новых систем иммунохроматографической диагностики фитопатогенов на основе закономерностей формирования комплексов антител и наночастиц», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 4.1.3 Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений и 1.5.6 Биотехнология

Актуальность работы. Бесконтрольное распространение фитопатогенов с посадочным материалом является серьезной проблемой во многих регионах мира. В последнее время фитопатогены становятся более агрессивными под воздействием многократных химических обработок, меняющихся климатических условий, часто переходят на нецелевые объекты, накапливаются в латентной форме, что затрудняет процесс их идентификации и вызывает серьезные потери урожая. Так, по данным ФАО, в мире болезни картофеля снижают урожай на 10- 25%, а в годы эпифитотий – на 80%. Система защитных мероприятий включает наличие постоянного контроля и диагностики инфекций на разных стадиях выращивания культур. Раннее выявление болезней растений является решающим фактором для предотвращения или ограничения их распространения. Существующие в настоящее время системы диагностики фитопатогенов часто являются трудоемкими и дорогостоящими. Поэтому в последние годы предпринимаются попытки разработки быстрых, видоспецифичных, высокочувствительных и экономичных тестов, которые могут быть успешно использованы не только в лаборатории, но и в полевых условиях. Такие тесты не требуют применения дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала. Данным требованиям в полной мере соответствует иммунохроматографический анализ, однако его чувствительность часто бывает недостаточной для выявления инфекций на ранних этапах заражения.

Автором в качестве объектов исследований были выбраны экономически значимые фитопатогены вирусной (X-вирус картофеля, Y-вирус картофеля) и бактериальной (возбудители черной ножки картофеля (*Dickeya* spp.), бактериального ожога (*Erwinia amylovora*) и бурой гнили картофеля (*Ralstonia solanacearum*) природы – приоритетные возбудители болезней растений семейств *Solanaceae* и *Rosaceae*. Высококочувствительные системы для определения перечисленных выше фитопатогенов позволяют эффективно контролировать качество посадочного материала, а также своевременно выявлять возникновение инфекционных очагов. Поэтому актуальность исследований по разработке новых иммунохроматографических систем диагностики фитопатогенов с высокой чувствительностью не вызывает сомнения.

Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов. Автором показано, что предварительное формирование комплексов вирусов с конъюгатом (антитела – наночастицы золота) приводит к снижению предела обнаружения иммунохроматографической тест-системы. Определены условия (схема введения и соотношения конъюгатов), при которых формирование комплексов конъюгатов наночастиц золота и магнитных наночастиц вызывает снижение предела обнаружения иммунохроматографического анализа. Разработана иммунохроматографическая система для детекции *Ralstonia solanacearum*, высокая чувствительность которой обеспечивается благодаря увеличению размера маркера после формирования иммунных комплексов на тест-полоске. Разработана высокочувствительная иммунохроматографическая система для детекции бактерии *Erwinia amylovora* с использованием в качестве метки биметаллических наночастиц (Au-Pt). Показано, что использование нескольких проб, взятых от одного растения, значительно увеличивает достоверность иммунохроматографического анализа.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследований состоит в разработке и апробации

иммунохроматографических тест-систем для детекции трех бактериальных фитопатогенов – возбудителей экономически значимых болезней: черной ножки картофеля, бурой гнили картофеля и бактериального ожога плодовых культур. Разработаны и апробированы иммунохроматографические тест-системы для высокочувствительной детекции X- и Y- вирусов картофеля. Подходы, предложенные для разработки высокочувствительных тест-систем, могут быть использованы и для других фитопатогенов. Проведенная апробация тест-систем свидетельствует об их эффективности для внелабораторного скрининга и выявления латентных инфекций.

Рекомендации по использованию результатов работы. Полученные в диссертационной работе результаты исследований могут быть использованы в учебном процессе, а также в лабораториях по диагностике фитопатогенов и при проведении обследований насаждений в полевых условиях.

Степень достоверности и обоснованности результатов исследований подтверждается методами статистического анализа данных, а также положительными результатами апробации разработанных тест-систем. Материалы диссертационного исследования апробированы на многочисленных научно-практических конференциях различного уровня и в научной печати, где по материалам диссертации опубликовано 17 работ, из них 4 статьи в научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, 2 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, и 11 тезисов конференций.

Соответствие диссертации и автореферата. Представленная диссертационная работа содержит все необходимые для подобного рода исследований разделы. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Общая характеристика работы. Диссертация Раза Шиатесы представляет собой законченный, логически выстроенный научный труд, изложена на 154 страницах; состоит из введения, основной части,

содержащей 42 рисунков, 9 таблиц, заключения, списка литературы, включающего 195 источников, и 2 приложений.

Во введении обоснована актуальность и научная новизна исследований, сформулированы цель и задачи, научная новизна работы, ее практическая и теоретическая значимость, а также положения, выносимые на защиту.

В первой главе «Обзор литературы» рассмотрены вопросы биологии бактериальных и вирусных фитопатогенов, даны их характеристики и морфология. Представлена информация о существующих методах детекции фитопатогенов, подробно рассмотрены особенности и применение иммунохроматографических тест-систем.

Во второй главе «Материалы и методы» подробно представлены способы получения антител и антигенов, использованных в работе, описан процесс синтеза и даны характеристики полученных наночастиц и их конъюгатов. Изготовлены иммунохроматографические тест-системы, представлены этапы проведения иммунохроматографического анализа.

В третьей главе «Результаты и обсуждение» содержатся результаты по следующим этапам исследований: получение и характеристики сывороток; выделение и характеристика антител к изучаемым фитопатогенам; синтез и характеристика наночастиц; синтез конъюгатов наночастиц с биомолекулами с целью разработки иммунохроматографических тест-систем для детекции *Dickeya* spp, *E. amylovora*, УВК, ХВК; установлены особенности ИХА с предварительным смешиванием, с двойным усилением для детекции бактериальных патогенов.

В Заключении автором приведен анализ выполненных исследований с четкой формулировкой полученных результатов. Выводы полностью соответствуют поставленной цели и задачам, отражают суть проведенных автором исследований.

Диссертация грамотно оформлена, проиллюстрирована графиками и таблицами, изложена научным языком.

По диссертационной работе имеются некоторые замечания и пожелания:

1. Представленный автором метод детекции фитопатогенов заявлен к использованию не только в лаборатории, но и в полевых условиях. В связи с этим возникает вопрос: в какой степени полевые условия (температура, влажность воздуха, отсутствие стерильных условий) могут оказать влияние на чувствительность и достоверность предложенных иммунохроматографических тест-систем.

2. При оценке достоверности разработанных тест-систем для диагностики *Dickeya* spp, вирусов YVK и ХВК автор использовал ИХА и ИФА, а для диагностики *Erwinia amylovora* – ИХА и ПЦР. На наш взгляд, желательно было сравнивать результаты 3-х методов: ИХА, ИФА и ПЦР. В табл. 3 необходимо было указать величину экстинкции сероотрицательного контроля для ИФА.

3. Используемые автором микроплаты для ИФА фирмы Costar часто способствуют формированию так называемого "краевого эффекта", когда в крайних рядах лунок отмечаются повышенные значения экстинкции образцов. Желательно пояснить, имел ли место краевой эффект на данных микроплатах в исследованиях автора и предпринимались ли специальные приемы по его нивелированию.

4. В процессе совершенствования ИХА для диагностики вируса ХВК автором использован прием концентрирования магнитных частиц в магнитном поле, однако параметры магнитного поля не указаны.

5. В ряде случаев в автореферате и диссертации фирма Bioreba указана как функционирующая в Швейцарии, а иногда (с. 30 диссертации) – в Швеции.

6. В диссертации иногда встречаются неудачные термины и выражения, например, "вялый вид" (с. 16), "случайные корни" (с. 17), "грибки" (с. 17), яблоко (вместо яблони, с. 74).

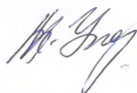
Указанные замечания и пожелания не снижают научную и практическую значимость полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку работы.

Заключение. Считаю, что по актуальности исследований, теоретической и практической значимости, объему экспериментальных данных диссертация Разо Шиатесы «Разработка новых систем иммунохроматографической диагностики фитопатогенов на основе закономерностей формирования комплексов антител и наночастиц», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 4.1.3 Агрономия, агропочвоведение, защита и карантин растений и 1.5.6 Биотехнология, является законченной научно-квалификационной работой.

Диссертация 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 23.09.2019 г., а её автор Разо Шиатеса заслуживает присуждения ей учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 4.1.3 Агрономия, агропочвоведение, защита и карантин растений и 1.5.6 Биотехнология.

Официальный оппонент:

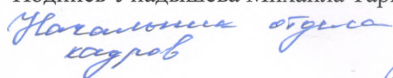
Главный научный сотрудник лаборатории защиты растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства», доктор сельскохозяйственных наук по специальности 06.01.07 – Защита растений, профессор РАН, член-корреспондент РАН

 Упадышев Михаил Тарьевич


«20» ноября 2022 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства», 115598, Москва, ул. Загорьевская, 4, тел. (495) 329-51-66, e-mail: fncsad@fncsad.ru

Подпись Упадышева Михаила Тарьевича удостоверяю:

 *Иванов*



 *Жоржова*