

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента Милюковой Натальи Александровны  
на диссертацию Башкировой Иды Геннадьевны  
«ИЗУЧЕНИЕ ФИТОПЛАЗМ ИЗ ГРУПП APPLE PROLIFERATION И  
STOLBUR С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ  
МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология**

В настоящее время наблюдается активное развитие отраслей сельского хозяйства, возрастает потребность в производстве экологически чистой продукции. В современных сортах и гибридах сельскохозяйственных культур совмещаются многие хозяйственно важные характеристики, такие как высокая продуктивность, адаптация к условиям региона возделывания, отличные технологические качества продукции, что открывает широкие возможности для переработки и производства различных продуктов питания. Но на протяжении уже нескольких десятилетий для многих сельскохозяйственных культур проблема поражаемости широким кругом вредителей и болезней остается открытой. Отдельную ступень среди патогенов сельскохозяйственных растений занимают фитоплазмы как специфическая группа микроорганизмов, которая наносит существенный урон продуктивности и качеству продукции растениеводства. На сегодняшний день известны заболевания, такие как карликовость шелковицы, желтуха астр, «ведьмины метлы» картофеля, филлодия клевера, столбур пасленовых, пролиферация яблони, которые первоначально считались заболеваниями с неуточненной этиологией. Развитие методов диагностики, в особенности молекулярно-генетических, способствовало совершенствованию технологии возделывания важнейших сельскохозяйственных культур и оптимизации методов борьбы с патогенами, в частности, с фитоплазмами.

Фитоплазменная инфекция в большинстве случаев приводит к значительным потерям урожая по всему миру, иногда потери могут достигать 100 %. Фитоплазмы очень трудно или почти невозможно идентифицировать с

помощью традиционных культуральных приемов, они не культивируются на питательных средах. С развитием современных, точных и чувствительных методов молекулярно-генетического анализа можно получить более полную информацию об этих микроорганизмах, классифицировать их и, в конечном итоге, оптимизировать методы борьбы с заболеваниями сельскохозяйственных культур, обеспечив тем самым возможность получения качественной продукции. Данная проблема важна не только с точки зрения сельского хозяйства, но и для экологии и микробиологии.

Учитывая вышесказанное, актуальность темы представленной диссертационной работы Башкировой Иды Геннадьевны, связанной с изучением распространения, выявления и идентификацией особо опасных фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur с помощью молекулярно-генетических методов диагностики, очевидна.

В проделанной работе Башкировой И.Г. глубоко проработан теоретический материал, четко сформулированы цели и задачи исследования. Изучена степень распространения особо опасных фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur на территории РФ и некоторых зарубежных стран. Многие этапы исследования выполнены впервые, как, например, осуществлен сравнительный анализ и апробация методов выделения ДНК фитоплазм из растительного материала с использованием различных методик и наборов реагентов; предложены оптимальные реакционные смеси отечественного производства для проведения ПЦР и отжига праймеров, что позволяет достоверно проводить идентификацию фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur. Успешно апробированы тест-системы отечественного производства для видовой идентификации изучаемых фитоплазм. Проведена видовая идентификация полученных в ходе исследования нуклеотидных последовательностей на основе изучения участков 16S-23S рРНК гена. Полученные оригинальные нуклеотидные последовательности фитоплазм из группы Apple proliferation депонированы в NCBI.

Большой объем выполненных экспериментальных исследований с использованием современных высокоинформативных методов указывает на достоверность и обоснованность научных положений диссертационной работы. Полученные результаты согласуются с общетеоретическими и практическими подходами, принятыми в мировом научном сообществе.

Теоретическая и практическая значимость представленной к оппонированию работы не вызывает сомнения. Рассмотрены все этапы молекулярно-генетического анализа выбранного объекта – от выделения ДНК микроорганизмов до предоставления результатов секвенирования в Международную базу данных, что позволяет в дальнейшем исследователям использовать представленную информацию при разработке методов видовой идентификации фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* и других групп фитоплазм. Использованный подход на основании изучения гена 16S-23S рРНК весьма перспективен, учитывая тот факт, что идентификация микроорганизмов является ключевым звеном в научных исследованиях и напрямую связана и с микробиологией, и с сельским хозяйством.

Диссертация Башкировой Иды Геннадьевны состоит из Введения, 3 глав, заключения, выводов, списка сокращений и библиографического списка и пяти приложений. Диссертационная работа изложена на 152 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц и 39 рисунков. Библиографический список использованной литературы включает 171 источник, среди которых 43 работы отечественных авторов и 128 иностранных.

Во Введении Башкировой И.Г. обоснована актуальность темы предлагаемой к защите работы, показана степень разработанности проблемы, сформулирована цель и поставлены задачи исследования, освещена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В Главе I «Обзор литературы по группам Apple proliferation и Stolbur» приведен анализ отечественной и зарубежной литературы, рассмотрены современные подходы к классификации фитоплазм и методы диагностики

фитопатогенных микроорганизмов с возможностью их применения для видовой идентификации фитоплазм.

Подробный анализ литературных данных позволил автору определить цель и четко сформулировать задачи исследования.

В Главе II «Материалы и методы» приведена характеристика изучаемого материала и методов исследования: представлен широкий спектр выбранных для исследования микроорганизмов, подробно описаны молекулярно-генетические методы идентификации фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur, охарактеризованы области применения каждого из взятого в исследование наборов реагентов, этапы и принципы работы с материалом в ходе диагностики и идентификации фитоплазм названных групп.

В Главе III «Результаты и их обсуждение» приведены результаты масштабного анализа по распространению фитоплазм на территориях России и зарубежных стран, рассмотрены различные методы выделения ДНК фитоплазм, эффективность которых оценена в соответствии с поставленными в диссертации целью и задачами. Выделение ДНК является первым и важным этапом работы, поскольку качество выделенной ДНК во многом определяет достоверность результатов и дальнейшее планирование работы. Автором выбраны наиболее эффективные наборы для экстракции ДНК фитоплазм, которые позволяют получать ДНК высокого качества и значительно экономить время проведения исследования в целом, что немаловажно при анализе большого количества материала. Оптимизация идентификации фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur методом ПЦР потребовала от автора не только выбора наиболее подходящей реакционной смеси из одиннадцати по соответствующим критериям, но и определение оптимальной температуры отжига праймеров, выбранных для исследования, что в совокупности с первым этапом работы позволило получить достоверные результаты и с высокой эффективностью использовать метод ПЦР в диагностике фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur. Важным этапом работы с точки зрения изучения фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur автором представлен метод

ПЦР-РВ с использованием универсальных праймеров, с помощью которого возможно выявлять единичные копии микроорганизмов в тканях растений, что в конечном итоге позволяет предотвратить значительные потери урожая. Особую значимость, на мой взгляд, приобретает тот факт, что автором осуществлена видовая идентификация фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur на основе изучения участков гена 16S-23S рРНК. Метод показал высокую эффективность при проведении видовой идентификации всех образцов фитоплазм, выявленных в ходе исследования, что, в свою очередь, позволяет сделать вывод не только о распространенности особо опасных микроорганизмов на территории Российской Федерации, но и вовремя принять меры по предотвращению распространения заболевания и борьбы с ним.

В заключении обобщены результаты проведенной работы, показано, как они согласуются с результатами аналогичных исследований. Выводы достоверны, научно обоснованы, соответствуют поставленным задачам.

Автореферат диссертации достаточно полно отражает материалы диссертации и по оформлению и содержанию соответствует требованиям ВАК РФ.

На основании результатов исследования автором разработаны методические рекомендации по диагностике, выявлению и идентификации фитоплазм.

Результаты диссертационного исследования апробированы, обсуждены и доложены на семи научно-практических конференциях, в том числе международных. По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе три статьи на иностранном языке в изданиях Scopus.

Анализ диссертационной работы позволил выявить следующие замечания и пожелания:

1. Обзор литературы представлен достаточно подробно и говорит о глубокой теоретической проработке автором исследуемого вопроса. Но, на мой взгляд, следовало бы более подробно остановиться на объектах и методах, непосредственно использованных в диссертации,

что также позволило бы более полно раскрыть актуальность исследования.

2. На с. 73 представлена классическая методика выделения ДНК микроорганизмов Doyle & Doyle и отмечена ее высокая трудоемкость. Пояснение, в чем именно состояла трудоемкость процесса и на каких этапах отмечаются большие временные затраты, не представлено, хотя это важно с методической точки зрения и должно учитываться исследователями при выборе метода экстракции ДНК фитоплазм.
3. Кроме того, хотелось бы отметить, что при выборе той или иной методики или набора реагентов, целесообразно также упомянуть их стоимость, и, соответственно, представить себестоимость оценки образца. Эта информация, по моему мнению, также может быть учтена при выборе оптимальных методик при работе с фитоплазмами как самим автором работы, так и другими исследователями.

Высказанные замечания не снижают значимости проведенных соискателем исследований. На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Башкировой И.Г. «Изучение фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur с помощью молекулярно-генетических методов диагностики» является завершенной, комплексной научно-квалификационной работой, выполненной на актуальную тему.

По своей актуальности, научно-практической и теоретической значимости результатов, методическому уровню и объему исследований диссертационная работа соответствует критериям раздела II Положения о присуждения ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов», утвержденного Ученым советом РУДН 23.09.2019, протокол № 12, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а соискатель, Башкирова И.Г., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Согласна на сбор, обработку, хранение и размещение в сети «Интернет» моих персональных данных (в соответствии с требованиями Приказа Минобрнауки России №662 от 1 июля 2015 года), необходимых для работы диссертационного совета ПДС 0300.010.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук, 03.00.15 Генетика  
старший научный сотрудник  
лаборатории маркерной и геномной  
селекции растений  
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский  
институт сельскохозяйственной  
биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ)

Н.А. Милюкова

« 08 » сентября 2023 г.

Адрес организации:

127434 г. Москва, ул. Тимирязевская, 42

Тел./факс: +7 (499) 976-65-44,

E-mail: [iab@iab.ac.ru](mailto:iab@iab.ac.ru); <http://www.vniisb.ru>



Подпись: Милюкова Н.А.  
Заведующий сектором  
учетный секретарь ФГБНУ ВНИИСБ  
Е.И. Федина  
09 2023