

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Махмуди Нилуфар

«Сравнительный морфометрический анализ нематод *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 популяций иранского и российского происхождения и разработка новых тест-систем для их молекулярно-генетической идентификации».

Специальность: 4.1.3. Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений.

Знакомство с диссертационной работой показывает, что Махмуди Нилуфар выполнена исключительно интересная работа, представляющая высокую теоретическую и практическую научную значимость.

Актуальность исследования основана на том, что экономические потери от болезней и вредителей сельскохозяйственных культур в настоящее время значительны во всем мире. Среди них нематоды, поражающие большой набор растений-хозяев, являются одними из самых трудно контролируемых объектов карантина. К ним относятся и представители рода *Ditylenchus* Filipjev, 1936, который состоит из более чем 90 описанных видов. В свою очередь из них для двух видов *D. destructor* (стеблевая нематода картофеля) и *D. dipsaci* (стеблевая нематода лука) очень важны точное обнаружение и идентификация, так как во многих странах мира эти два вида являются объектом карантина. В отличие от морфометрических методов, идентификация нематод с использованием различных молекулярных инструментов обеспечивает точную и быструю диагностику исследуемых видов. Основные современные проблемы картофелеводства, связаны с контролем качества семенного материала, отсутствием надлежащего севооборота, а в ряде стран и с отсутствием доступа к соответствующим технологиям производств, поэтому распространение и размер ущерба, наносимого *D. destructor* в РФ ежегодно увеличиваются. Таким образом, для принятия своевременных мер по обнаружению и недопущению распространения паразитических нематод крайне важна их точная идентификация. Однако, известные в настоящее время молекулярные методы диагностики *D. destructor* не вполне надёжны, так как не всегда дают стабильный результат.

Актуальность выбранного направления исследований заключается в том, автор впервые проводит интегративное исследование важного карантинного вида - стеблевой нематоды картофеля *Ditylenchus destructor* с последующей разработкой и внедрением молекулярных тест-систем идентификации паразитов.

Степень разработанности темы. Автором подробно проработана литература по исследуемой тематике. Проведено сравнение возможностей морфологической и молекулярной идентификации нематод. Приводится перечень сложностей морфологического определения паразитов, его трудоемкости и труднодоступности, а также указана проблема многофакторности морфологической изменчивости нематод, в том числе если образцы содержат смешанные виды рода *Ditylenchus*.

Приводится обоснование и методика выбора молекулярных методов для быстрой и четкой идентификации видов на основе видоспецифичных праймеров, которые и предполагается создать в результате работы.

Целью диссертационной работы было исследование нематод *D. destructor* из географически удалённых популяций и разработка нового метода видоспецифической ПЦР для идентификации картофельной стеблевой нематоды. Поставленные задачи исследований, в особенности, экспериментальной направленности позволили автору реализовать намеченные цели и добиться новых и значимых результатов.

Научная новизна исследований включает в себя впервые проведенный сравнительный морфометрический и генетический анализ популяций *D. destructor* из России и Ирана; разработку двух наборов пар видоспецифических праймеров для молекулярной диагностики популяций *D. destructor* с высокой чувствительностью и селективностью.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в получении интегративной характеристики (морфологической и генетической) вида *D. destructor* на основе материала из иранских и российских популяций.

Разработаны новые видоспецифичные для картофельной стеблевой нематоды *D. destructor* праймеры. Доказана их аналитическая чувствительность, эффективность и специфичность. Практически предложенные методы могут быть использованы для быстрой диагностики нематод вида *D. destructor* из любых регионов, что важно для проведения карантинных мероприятий. Кроме того, полученные результаты исследований могут быть использованы в качестве методических указаний как в практической работе государственных контролирующих органов, так и в учебном процессе.

Автором проведен значительный объем работ и подготовлена хорошо структурированная и легкая для восприятия рукопись диссертации объемом 108 страниц, которая состоит из введения, трёх глав, выводов и приложений, содержит 20 таблиц и 24 рисунков. Список литературы включает 123 источника на иностранных и русском языках.

Во **Введении** обоснованы актуальность и научная новизна исследования, четко сформулированы поставленные цель и задачи, а также положения, выносимые на защиту.

Первая Глава представляет собой обширный литературный обзор по теме исследования. Диссертанткой охвачены многочисленные, имеющиеся к данному моменту, публикации по систематике нематод рода *Ditylenchus*, различным аспектам экологии, биологии и морфологии вида *Ditylenchus destructor*. Особое внимание автором уделено изучению методов борьбы с вредителями. Тщательно проработаны вопросы молекулярной идентификации, в том числе методики, применяемые в карантинных целях. Глубокий уровень проработки материала, показанный в этой главе, отражает значимое теоретическое обоснование для проводимых автором исследований и производит весьма хорошее впечатление о работе.

Во **Второй Главе** диссертации приведены подробные данные по материалу исследования, местам сборов, методам изучения нематод, что в значительной степени облегчает понимание материала и делает его доступным для последующих размышлений.

Махмуди Нилуфар обработан различными методами огромный материал. Выборки нематод собраны из нескольких регионов Российской Федерации и Ирана. Морфометрический анализ проведен на почти 2000 экземплярах нематод. Для молекулярного анализа использовано 350 экземпляров червей из семи населенных пунктов обеих стран. Описание периодов и районов проведения работ, методов сбора, выделения, морфологического анализа исследования также приведены в деталях, с рисунками и четким обоснованием того, какой это материал, и для какого анализа использован. Аналогично благоприятное впечатление производят и тщательно прописанные протоколы молекулярных исследований (выделение ДНК, проверка и очистка продукта, секвенирование), указание использованных приборов, сопровождаемые поясняющими рисунками и фотографиями, что позволяет высоко оценить уровень применяемых методов и компетентность автора.

Третья Глава диссертационной работы посвящена непосредственно результатам собственных исследований автора.

Махмуди Нилуфар исследован репрезентативный объем материала, включающий картофельных нематод из нескольких популяций из Российской Федерации и Ирана. Несомненным достоинством работы является проведенный автором очень трудоемкий морфометрический анализ колоссального числа нематод (почти 2000 экз.). В результате получены данные по морфометрической изменчивости популяций *D. destructor* из двух стран, показывающие незначительные отличия по размерности отдельных признаков

нематод, не влияющие на общую морфологическую характеристику вида, т.е. отнесение всех популяций к виду *D. destructor*. Результаты анализа приведены как подробное морфометрическое описание, сопровождаемое хорошим иллюстрационным материалом (фотографиями) и таблицами. Также выделены отличительные признаки самок и самцов в разных популяциях. Автор для сравнения привлекает доступные литературные материалы по морфологии разных видов рода *Ditylenchus* для проведения морфометрического сравнения, что является несомненным плюсом работы и в очередной раз подчеркивает высокий уровень владения изучаемой тематикой.

Еще одним несомненным достоинством работы надо считать использование в комплексе с морфометрией для идентификации *D. destructor* молекулярно-генетических методов. Это позволяет исследовать генетическую изменчивость популяций *D. destructor* и таким образом интегративно охарактеризовать вид паразита в пределах границ распространения. Проведенная филогенетическая реконструкция достоверно показывает отношение всех полученных автором последовательностей, даже для популяций разного географического происхождения и разных растений-хозяев, к одному виду *D. destructor*. При этом очень интересна находка молекулярной вариабельности участка ядерного генома (ITS) у паразитов из различных географических популяций *D. destructor* и разных растений-хозяев (*Solanum tuberosum*, *Ipomoea batatas*, *Daucus carota subsp*). Кроме того, согласно филогенетическому анализу молекулярные последовательности нематод из иранских популяций более близки к таковым *D. destructor*, обнаруженным в Китае, а последовательности представителей нематод из российских популяций совпадают с теми, что уже ранее были идентифицированы другими исследователями.

Важным практическим аспектом диссертационной работы является проведенная Махмуди Нилуфар разработка новых тест-систем для молекулярно-генетической идентификации паразитов *D. destructor*, которые могут обеспечить быстрый и надёжный метод для идентификации особей *D. destructor*, выделенных из разных растений-хозяев в различных географических регионах.

Автором проведены хорошо продуманные экспериментальные исследования на примере трех видов рода *Ditylenchus* – *D. destructor*, *D. dipsaci* и *D. gigas* для получения новых видоспецифических праймеров для молекулярной диагностики, а также определение их селективности и чувствительности. В данном разделе подробно приведены все детали проводимых экспериментов, указаны программы, использованные для молекулярной реконструкции, приведены рисунки множественных выравниваний последовательностей рДНК-ITS *D. destructor* и других видов *Ditylenchus* из базы данных ГенБанка (GenBank NCBI), используемых для разработки обоих видоспецифических

праймеров, а также фото электрофореграмм с результатами. Результат этой работы нашел отражение во взаимосвязи между наукой и «реальным миром»: визуализированный на электрофореграмме результат ПЦР с использованием разработанных автором праймеров даёт специфическую и чёткую полосу для каждого образца взрослой особи нематод *D. destructor*, которые были собраны с полей картофеля из различных географических популяций. При этом же автором достигнута весьма впечатляющая аналитическая чувствительность метода с новыми праймерами составляет (1 нг ДНК для пары dsn.1 F/R и 5 нг ДНК для пары dsn.2 F/R). Это открытие Махмуди Нилуфар предлагает значительные возможности применения научных данных для планирования и осуществления охранных, карантинных и управленческих мероприятий в агрокомплексе, и обязательно должно быть принято на вооружение службой РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР.

В **Заключении** автор кратко и понятно подводит итоги своей работы. Глава является логическим завершением анализа теоретического материала и экспериментальных исследований, а сделанные выводы полностью отражают полученные результаты.

Автореферат отражает суть работы, её объем и основные результаты.

Диссертационная работа хорошо оформлена. Текст написан понятным и простым языком, сопровождается необходимым иллюстративным материалом. К незначительным замечаниям, можно отнести лишь опечатки и некоторые ошибки пунктуации. Кроме того, у автора имеется прекрасная морфометрическая выборка, которую можно было бы обработать статистически с помощью дискриминантного и компонентного анализа (например, с использованием софта PAST) для более наглядной иллюстрации морфологического портрета вида *D. destructor*. Однако отсутствие этого анализа несколько не умаляет достоинств работы, и является скорее пожеланием автору в будущем к серии её отличных публикаций, посвященных молекулярным изысканиям по *D. destructor*, добавить еще и статьи по морфометрическому анализу паразитов.

В целом, характеризуя работу Махмуди Нилуфар, необходимо отметить, что диссертация выполнена на высоком научно-методическом уровне. Автором исследованы весьма актуальные теоретические и практические вопросы, выполнен значительный объем работ по сбору и обработке материала, проведению экспериментов, а полученные результаты представляют собой законченную научно-исследовательскую работу.

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 Махмуди Нилуфар заслуживает присуждения ей учёной степени кандидата

биологических наук по специальности 4.1.3 Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений.

Официальный оппонент:
Старший научный сотрудник ИБ КарНЦ РАН,
кандидат биологических наук,
03.00.19 - Паразитология, гельминтология

Лебедева Д.И.

Институт биологии — обособленное
подразделение Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки Федерального исследовательского
центра "Карельский научный центр
Российской академии наук"

185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская,
д.11, ИБ КарНЦ РАН
Телефон: +7(8142) 76-98-10
Факс: +7(8142) 76-98-10
E-mail: biology@krc.karelia.ru

