

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ

«ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха»

С.В. Жевора

«    »    2022 г.



## ОТЗЫВ

ведущей организации на работу 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», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.3 Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений

Диссертационная работа посвящена разработке быстродействующих и точных молекулярных тест-систем для идентификации вредоносных видов нематод. Были разработаны две пары праймеров, dsn.1 F/R и dsn.2 F/R., показаны их аналитическая чувствительность, эффективность и специфичность. Предлагаемые методы предназначены для экспресс-диагностики нематод *D. destructor*.

### Актуальность темы диссертационного исследования

Потери от болезней и вредителей сегодня значительны во всем мире, при этом одним из трудно контролируемых объектов являются нематоды, поражающие большой набор растений-хозяев. Среди многообразия нематод следует выделить род *Ditylenchus* Filipjev, 1936, который состоит из более чем 90 описанных видов. Наиболее важное хозяйственное значение среди нематод рода *Ditylenchus* имеют виды: *D. destructor*, стеблевая нематода картофеля; *D. dipsaci*, стеблевая нематода лука; *D. angustus*, стеблевая нематода риса и *D. gigas*, стеблевая нематода бобовых. Однако, точное обнаружение и идентификация видов *D. destructor* и *D. dipsaci* очень важна,

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 отсутствием доступа к соответствующим технологиям производства. Так с 2010 г. распространение и размер ущерба, наносимого данным видом нематод в РФ ежегодно увеличиваются. По оценкам, около 40 тысяч гектар товарного картофеля в настоящее время сильно заражены *D. destructor*.

Обычно, на заселенных нематодой территориях собранный урожай картофеля дает до 5% зараженных клубней. Чрезмерный полив, приводящий к высокому уровню влажности, может усилить инфекцию, в результате чего процент инфицированных клубней повышается до 10% и более, а в последующем инфекция нарастает в геометрической прогрессии. Из-за зараженного посадочного материала в Центральном и Приволжском регионах Российской Федерации в 2015-2019 годах потери урожая составили около 30%. В Иране большинство картофельных полей в центральных и западных регионах заражены *D. destructor*, что приводит к значительной потере урожая. 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*, в отличие от идентификации близкородственного вида *D. dipsaci*, не вполне надёжны, так как не всегда дают стабильный результат.

### **Степень разработанности темы**

Классическая идентификация нематод основана на морфологических и анатомических различиях с использованием микроскопического анализа изображений. Морфологическая идентификация относится к более дешевым методам идентификации и помогает связать морфологию с возможной

функцией и является важным инструментом для морфологов. Хотя наиболее эффективны для диагностики нематод, которые имеют тонкие морфологические и морфометрические различия, такие как длина тела, наличие и форма стилета, форма кончика хвоста и т. д., трудно различимы морфологически. Морфологическая идентификация нематод рода *Ditylenchus* требует таксономической экспертизы и является сложной задачей, если образцы содержат смешанные виды. Морфология также может быть изменена из-за различий в географическом местоположении, растении-хозяине, питании и других факторах окружающей среды, как это наблюдается у некоторых свободноживущих и паразитирующих на растениях нематод. Короче говоря, неспециалистам может быть трудно идентифицировать виды нематод с высоким уровнем достоверности только на основе морфологии, и для точной идентификации может потребоваться интеграция данных о суборганизмах, таких как последовательность ДНК. Для идентификации нематод было разработано множество методов на основе ДНК. Их можно разделить на методы, основанные на отпечатках пальцев и нуклеотидах. Методы на основе отпечатков пальцев могут включать полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP), полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP), случайную амплификацию полиморфной ДНК (RAPD) и использование видоспецифичных праймеров, которые зависят от наличия/отсутствия ПЦР-амплификации. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и/или недостатки по сравнению с другими методами идентификации нематод, основанными на ДНК или другими методами. Среди этих методов идентификации видоспецифическая ПЦР нам выгодна своей простотой, быстротой, специфичностью, отсутствием необходимости в дорогостоящем оборудовании и высокой квалификации специалистов для проведения анализа. Есть несколько универсальных праймеров для этих методов, которые можно использовать для идентификации *Ditylenchus destructor*. Однако универсальная грунтовка – это покрытие общего назначения, подготавливающее поверхность к

последующему покрытию. Выбор подходящих праймеров, вероятно, является самым важным фактором, влияющим на полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Специфическая амплификация намеченной мишени требует, чтобы праймеры не совпадали с другими мишенями в определенных ориентациях и на определенных расстояниях, которые допускают нежелательную амплификацию. Таким образом, в этом исследовании были разработаны две пары новых праймеров для повышения селективности и чувствительности анализа для популяций обеих стран.

**Целью диссертационной работы** являлась исследование географически удалённых популяций *D. destructor*, разработка нового диагностического метода видоспецифической ПЦР, а также апробация и усовершенствование существующих методов диагностики.

Поставленные задачи позволили автору получить результаты, отличающиеся значимостью, достоверностью и научной новизной.

#### **Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов**

Автором впервые проведен сравнительный морфометрический и генетический анализ популяций *D. destructor* российского и иранского происхождения

Разработаны два набора пар новых видоспецифических праймеров для молекулярной диагностики популяций *D. destructor* из России и Ирана.

Доказана высокая чувствительность и селективность новых праймеров dsn.1 F/R и dsn.2F/R для идентификации *D. destructor*.

**Теоретическая и практическая значимость результатов исследований** состоит в том, что проведенный автором сравнительный морфологический и генетический анализ нематод *D. destructor* показал незначительные морфологические различия между нематодами иранских и российских популяций, при этом генетический анализ выявил близость иранских нематод к китайским популяциям. Разработаны новые видоспецифичные для *D. destructor* праймеры. Доказана их аналитическая

чувствительность, эффективность и специфичность. Предложенные методы могут быть использованы для быстрой диагностики нематод вида *D. Destructor* из различных регионов происхождения, что позволит избежать ошибок при идентификации подкарантинных объектов.

Результаты исследований автора могут быть использованы в учебном процессе, а также в лабораториях по диагностике карантинных и некарантинных видов нематод.

**Степень достоверности и обоснованности результатов исследований** подтверждается методами статистического анализа данных, а также положительными результатами апробации разработанных тест-систем.

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих мероприятиях: Симпозиум, XIII Международный нематологический симпозиум «Нематоды и другие экдизозоя в условиях изменяющихся условий среды», Карельский научный центр РАН. Нижний Новгород (июль – август 2019 г.). Международный научный форум НАУКА И ИННОВАЦИИ – СОВРЕМЕННЫЕ КОНЦЕПЦИИ. НАУКА И ИННОВАЦИИ- СОВРЕМЕННЫЕ КОНЦЕПЦИИ. Россия (Москва, июль 2020 г.); Международный научный форум НАУКА МИРА: ПРОБЛЕМЫ И ИННОВАЦИИ. Россия (апрель 2021 г.).

По результатам диссертационного исследования опубликовано 8 статей, из них 2 Scopus, 3 в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, трое тезисов в материалах конференций и симпозиума.

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

### **Содержание диссертации, ее завершённость**

Диссертация Махмуди Нилуфар представляет собой завершённый, логически выстроенный научный труд, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, использованных в данной

работе, результатов исследований и их обсуждения, заключения, списка использованной литературы из 124 источников. Диссертация изложена на 108 страницах компьютерного текста, содержит 24 рисунка и 20 таблиц.

**Во введении** 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» рассматривается объект исследований - нематода *Ditylenchus destructor*, ее характеристики и морфология. Представлена информация о существующих методах молекулярного обнаружения и применении новых разработок для идентификационного анализа и сравнения различных популяций нематод из Российской Федерации и Ирана.

**Во второй главе** «Материалы и методы» подробно представлены параметры морфометрических измерений для сравнительного анализа популяций нематод иранского и российского происхождения, подробно описан процесс дизайна и характеристики видоспецифичных праймеров, представлены этапы проведения молекулярно-генетической диагностики..

**В третьей главе** «Результаты и обсуждение» содержатся результаты по следующим этапам исследований: морфометрические характеристики нематод *D. destructor* иранского и российского происхождения; филогенетический анализ нематод *D. destructor* иранского и российского происхождения; разработка видоспецифичных праймеров для идентификации *D.destructor*, оценка их селективности и чувствительности.

**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 достаточно грамотно оформлена, проиллюстрирована графиками и таблицами, изложена понятным литературным языком.

Автореферат соответствует диссертационной работе.

При изучении материалов представленной диссертационной работы возникли следующие замечания:

1. В работе отсутствует анализ распространенности нематод *D. destructor* как в РФ, так и в Иране, в связи с этим непонятно чем обоснован выбор регионов для анализа популяций.

2. В разделе 1.2.3. о вредоносности *D. destructor* в РФ и Иране автор упоминает Минскую и Могилевскую области, что никак не относится к территории Российской Федерации.

3. В списке литературы встречаются старые источники, датированные 1966 годом.

4. Непонятно с какой целью автор включил в работу фотографии лабораторного оборудования, достаточно было простого упоминания в тексте в разделе материал и методы.

5. В названии работы заявлен сравнительный анализ популяций нематод *D. destructor* иранского и российского происхождения, при этом количество иранских авторов в списке литературе крайне невелико.

Возникшие в процессе изучения диссертации замечания в целом не снижают научную и практическую значимость полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку работы.

### **Заключение**

Считаю, что представленное диссертационное исследование является вполне законченной научной работой, выполненной на хорошем методическом уровне. По актуальности исследований, теоретической и практической значимости работы, объему экспериментальных данных диссертация 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», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.3

