

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 Агрохимия, 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 экдизозоа 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

