

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу ЧАН ВАН КУАНГ «Идентификация и биологический контроль фитофтороза цитрусовых культур в горной местности северного Вьетнама», представленной на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.3. – агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений

Актуальность темы исследований. В современных условиях роста и совершенствования агротехнического сектора особенно актуальным становится поиск и разработка новых средств защиты растений, биологические способы борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных культур составляют перспективную и относительно безопасную альтернативу химическим средствам. Их успешное внедрение требует детального изучения распространения, жизненных стратегий, физиологии и биохимии как патогена, так и агента биоконтроля. Во Вьетнаме цитрусовые культуры занимают значительную и быстро развивающуюся долю сельскохозяйственного производства, в связи с этим, очень важны разработки эффективных и безопасных методов защиты цитрусовых от такого опасного патогена древесных растений как фитофтора.

В диссертационной работе Чан Ван Куанг проведено комплексное исследование особенностей развития фитофтороза цитрусовых в горной местности на севере Вьетнама, определены чувствительности патогенов к распространенным фунгицидам и предложен эффективный агент биоконтроля для этого заболевания на основе аборигенного бактериального штамма.

Научная новизна работы. Масштабных исследований болезней цитрусовых культур и методов борьбы с ним во Вьетнаме до этой работы не было. Получены новые данные и выявлено 11 патогенов, из которых 8 видов грибов родов *Phytophthora* и *Pythium*. При этом два вида *Phytophthora parvispora* и *Pythium deliense* выявлены в регионе впервые. Проведен поиск методов борьбы с ними и, впервые, продемонстрировано, что аборигенные штаммы *Bacillus pumilus* способны эффективно подавлять рост возбудителей фитофтороза.

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате работы получены данные о составе и распространении возбудителей фитофтороза цитрусовых культур, которые важны в глобальном масштабе для отслеживания и прогнозирования фитосанитарной обстановки. Особенно ценно, что в работе предложен и протестирован новый перспективный агент для биологического контроля заболевания на основе штамма VN-K13 *Bacillus*

pumilus, способный не только защищать растения от широкого круга патогенов, но и стимулировать их рост и улучшать состояние. Практическое значение могут иметь выводы о значимости не застойного гидрологического режима в садах для снижения заболеваемости гомозом цитрусовых.

Методы работы и оценка достоверности полученных результатов. Работа основана на результатах тщательной проработки большого объема оригинального материала. В работе использованы как классические культуральные и морфологические исследования, так и современные подходы и методы анализа. Полученные результаты статистически обработаны и проанализированы с учетом работ других авторов. Таким образом, обоснованность научных положений и выводов, которые, безусловно, соответствуют проведенным исследованиям, не вызывает сомнений.

Общая характеристика работы. Рассматриваемая работа изложена на 151 странице, содержит 11 таблиц, 19 рисунков и 3 приложения. Структурно диссертация состоит из введения, 3-х глав основной части, заключения, которое содержит выводы, списка использованной литературы и 3-х приложений, включающих список выделенных изолятов *Phytophthora*, данные о нуклеотидных последовательностях, использованных в филогенетических построениях, а также оригинальные последовательности исследованных автором штаммов. Список литературы содержит 232 работы на иностранных языках.

Материалы диссертации были представлены на 2-х конференциях, по результатам опубликовано 8 печатных работ, из них 3 статьи в журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science, 2 статьи в журналах из списка ВАК.

Содержание работы. В работе содержатся все требуемые разделы, оформление соответствует рекомендациям для диссертационных работ. Текст автореферата соответствует основному содержанию диссертации.

Первая глава «Обзор литературы» посвящена тщательному анализу современного состояния изучения агротехники цитрусовых культур, подверженности их заболеваниям. Большое внимание уделено различным видам оомицетов рода *Phytophthora*, подробно описаны симптомы поражения и способы передачи. Дана оценка распространенности *Phytophthora* spp, в основных регионах выращивания цитрусовых. Также, рассматриваются стратегии борьбы с болезнями цитрусовых деревьев. В следующей части обзора дана характеристика бактерий рода *Bacillus* и их потенциала для биологического контроля болезней и стимуляции роста растений. Особое внимание уделено биоконтролю грибных патогенов. Обзор написан

достаточно хорошо, логично построен, четко структурирован, литература по теме полно проработана.

Во второй главе «Материалы и методы исследований» изложены примененные методики. Начиная с обследования цитрусовых садов и сбора образцов поражений, выделения чистых культур Oomycetes, их морфологических исследований, молекулярной идентификации видов. Следующий блок посвящен методам изучения патогенов, тестированию патогенности и чувствительности фитофторы к фунгицидам *in vitro*. Далее подробно описаны методики работы с изолятами бактерий, их условия культивирования, определение антагонистической активности с помощью пластинчатой конфронтационной культуры и диско-диффузионным методом. Дальнейшим шагом стало изучение физиологических и биохимических особенностей антагонистов, их бактериальных ЛОС, производства ферментов и вторичных метаболитов. Подробно описаны методики экстракции, очистки ДНК, ПЦР и филогенетический анализ бактерий. Метод оценки влияния бактериального раствора *B. pumilus* на зооспоры *Phytophthora* spp. Испытание антагониста для биологического контроля фитопфтороза на цитрусовых растениях в горшечной культуре. И включает методическую главу раздел с описанием статистического анализа полученных данных. В целом, методики описаны достаточно четко и подробно.

Третья глава «Результаты исследований» посвящена изложению итогов работы и содержит 7 разделов с подразделами, которые логично выстроены и представляют ход работы от исследования заболеваемости цитрусовых в горных провинциях северного Вьетнама, до апробации в горшечном эксперименте нового биологического средства защиты этих растений.

Состояние современного производства цитрусовых оценено по результатам обследования 815 садов, расположенных в горных областях четырех северных провинций Вьетнама. Изучение состава заболеваний, которым подвержены цитрусовые деревья выявил 11 болезней цитрусовых деревьев: 8 грибных, 2 бактериальных и 1 заболевание неинфекционной природы. Наиболее распространенными были пожелтения листьев, корневая гниль и гуммоз. Показано, что в низменных, плохо дренируемых участках, заболеваемость была выше, чем на более сухих территориях.

Анализ распространенности *Phytophthora* spp., в основных регионах выращивания цитрусовых на основе морфологического и молекулярного анализа выявил виды из родов *Phytophthora* и *Pythium* в качестве патогенов. Идентифицировано пять видов *Phytophthora* (*P. citrophthora*, *P. nicotianae*, *P. mekongensis*, *P. parvispora*, *P. palmivora*) и четыре вида *Pythium* (*P. deliense*, *P. cucurbitacearum*, *P. inflatum*, *P. carolinianum*), причем впервые во Вьетнаме

были обнаружены *Phytophthora parvispora* и *Pythium deliense*, а *Phytophthora mekongensis* была новой для горных районов северного Вьетнама.

Проведена подробная морфологическая характеристика видов *Phytophthora* spp., связанных с гуммозом цитрусовых, а также их молекулярная идентификация. Испытание патогенности изолятов и показано, что *P. mekongensis* и *P. citrophthora* являются наиболее агрессивными видами среди протестированных *Phytophthora* spp., а помело, более восприимчивы к инфекции чем плоды апельсина и лайма.

Важным разделом является испытание чувствительности *Phytophthora* spp. к фунгицидам. Испытания «in vitro» пяти фунгицидов показали, что металаксил и диметоморф наиболее эффективны против *Phytophthora*.

Интерес представляет первое сообщение о выявлении вида *Pythium deliense*, ассоциированного с гуммозом во Вьетнаме, выделенного из почвы ризосферы пораженных апельсиновых деревьев.

Важную часть работы представляет изучение аборигенной микробиоты ризосферы цитрусовых, имеющей ингибирующую активность против роста *Phytophthora* spp. Выявлено 4 штамма с высокой антагонистической активностью, молекулярная идентификация их по локусам 16S РНК, *gyrB* и *pyrE*, показала, что все относятся к *Bacillus pumilus*. Они значительно подавляли рост *Phytophthora* spp., причем *B. pumilus* VN-K13 показал самую высокую эффективность.

У этих штаммов были изучены физиологические и биохимические особенности. Показано, что они продуцировали сидерофоры, аммиак, индол-3-уксусную кислоту, а также ферменты, такие как хитиназа и целлюлаза. Их летучие органические соединения (ЛОС) также подавляли рост *Phytophthora*. Были установлены гены, ответственные за производства итирина, субтилина и бацилизина. Оценено влияние бактериального раствора *Bacillus pumilus* на зооспоры *Phytophthora* и показано снижение энергии заражения.

На последнем этапе проведены тепличные испытания *B. pumilus* VN-K13 на горшечных культурах с проростками цитрусовых культур. Показано уменьшение корневой гнили, вызванной *Phytophthora*, и улучшение параметров роста апельсиновых деревьев (*Citrus sinensis* cv. Sanh), продемонстрирован потенциал штамма в качестве эффективного агента биологического контроля.

Хочется отметить, что работа хорошо иллюстрирована фотографиями, отражающими культурально-морфологические и микроскопические особенности изучаемых видов, а также иллюстрирующими состояния растений

в экспериментах. Оформление таблиц, в целом, также хорошо и четко демонстрирует полученные данные.

Завершает диссертационную работу заключение, где приведены выводы. Выводы диссертации обоснованы, полностью вытекают из ее содержания и соответствуют целям и задачам исследования. Научные положения, выносимые на защиту, также, обоснованы.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Автореферат диссертационной работы по структуре, содержанию и выводам соответствует диссертации и достаточно полно отражает ее основные положения, выносимые на защиту.

Личный вклад автора заключается в проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, подготовке материалов научных публикаций и написании диссертационной работы.

Вопросы и замечания к работе. Несмотря на целостность и масштабность проведенного исследования, к работе есть несколько замечаний и вопросов.

1) Вероятно, по результатам работы можно было бы составить практические агротехнические рекомендации для организации работ в цитрусовых садах горных территорий на севере Вьетнама.

2) В Приложении В. (Таблица S2 Штаммы *Phytophthora*, использованные в филогенетических анализах, и их номера доступа к «GenBank») в сноске дана расшифровка «NT: Non-type» – вероятно имелся в виду Neo-type.

4) В работе неизбежно присутствует некоторое количество опечаток и несогласований, но это не умаляет ее научной значимости.

5) Не очень типично для диссертационных работ совмещение раздела «заключение» с выводами, обычно в работах присутствуют оба эти раздела.

Приведенные замечания носят формальный характер и не относятся к существу проведенной работы, они не могут снижать ее ценности и значения.

Работа в целом производит очень хорошее впечатление, хочется отметить большой объем материала, обработанного и проанализированного, как классическими, так и современными методами, а также разностороннее исследование проблемы и подведение к практической разработке.

Заключение. Диссертационное исследование Чан Ван Куанг «Идентификация и биологический контроль фитофтороза цитрусовых культур в горной местности северного Вьетнама» является законченной научно-квалификационной работой, в которой находятся новые решения научной задачи по совершенствованию контроля заболеваемости цитрусовых

культур фитотрофом, и внесла существенный вклад в разработку новых биотехнологических препаратов, что найдет применение при решении подобных задач при защите растений. Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук согласно п. 2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней федеральном государственном автономном образовательном учреждении «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН), утвержденного диссертационным советом РУДН, протокол № 12-П/3 от 28/06/2024 г., а ее автор Чан Ван Куанг, заслуживает присуждения ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.3 – Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений (сельскохозяйственные науки).

Официальный оппонент:
Александрова Алина Витальевна
доктор биологических наук по специальности 03.02.12 – микология (биол. науки)
ведущий научный сотрудник кафедры микологии и альгологии
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет
119234, Москва г, Ленинские горы ул, д. 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, кафедра микологии и альгологии
+7 (495)-939-54-82
alexandrova@mail.bio.msu.ru

Александрова Алина Витальевна

25 ноября 2024 г.

Подпись доктора биологических наук А.В. Александровой удостоверяю:

Ученый секретарь биологического факультета МГУ



Е.В. Петрова