

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Тараканова Рашита Ислямовича на тему «Биологические свойства возбудителей бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости сои и меры защиты», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.3. Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений

Актуальность избранной темы. В последние десятилетия наблюдаются тенденции изменения видового состава и повышения вредоносности бактериальных комплексов полевых культур. Распространение инфекций растений, способных нанести ущерб сельскому хозяйству, является одной из основных биологических угроз, а проведение исследований в области изучения свойств фитопатогенов и борьбы с их распространением является неотъемлемой частью деятельности по обеспечению биологической безопасности в соответствии с законодательством Российской Федерации. Бактериальные болезни такой стратегически значимой культуры для Российской Федерации, как соя, могут приводить к прямым потерям урожая зерна сои до 40 %, снижать масличность и посевные качества семенного материала. В связи с высокой вредоносностью, способностью передаваться с семенами на дальние расстояния, а также фитосанитарными требованиями стран-импортеров российской сельскохозяйственной продукции, к наиболее значимым бактериальным патогенам сои относятся возбудитель бактериального ожога *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* и возбудитель ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Биологические особенности указанных возбудителей, методы их идентификации и эффективные меры борьбы с вызываемыми бактериозами на сое изучены недостаточно. В связи с этим, тема диссертационного исследования Тараканова Рашита Ислямовича, посвященная уточнению биологических свойств возбудителей бактериального ожога, ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания, и усовершенствование приёмов защиты сои от них, является весьма актуальной.

Научная новизна. Диссертантом впервые проведена характеристика биологических свойств штаммов возбудителей бактериального ожога (Psg) и ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания сои (Cff), выделенных из фитоценозов на территории РФ. Проведен анализ генетического полиморфизма штаммов возбудителей бактериозов сои, в ходе которого для штаммов Cff и Psg показана высокая и низкая степень генетического полиморфизма, соответственно. Установлено, что штаммы Psg, выделенные из растений сои российского происхождения, относятся к расе 4, как и большинство штаммов в мире. Филогенетический анализ последовательностей гена *alaS* штаммов Cff показал, что штаммы, выделенные с сои, были генетически близки к штаммам из сорных растений, что может указывать на их возможную роль как резерваторов инфекции. Впервые разработана мультиплексная система на основе ПЦР в режиме «реального времени» для одновременной диагностики Psg и Cff в семенах сои. Выделены и детально изучены бактериофаги Psg и Cff, оценена эффективность их применения на искусственном инфекционном фоне. Впервые проведено тестирование антибактериальной активности веществ растительного происхождения в отношении Psg и Cff и показана эффективность их применения на искусственном инфекционном фоне. Впервые показаны сортовые различия сои по восприимчивости к заражению Psg и Cff. Показана высокая антибактериальная активность нового класса действующих веществ фунгицидов (четвертичные аммониевые соединения) в отношении возбудителей бактериозов сои.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна. Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается согласованностью полученных в ходе использования современных общепринятых методов экспериментальных данных с теоретическими научными положениями в исследуемой области. Выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, сделаны на основе тщательно спланированных, комплексно подобранных опытов, проведенных на большом

экспериментальном материале, подкреплены практическими результатами, статистической обработкой данных и иллюстративным материалом. Диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной проблемы и представляет собой целостное научное исследование, что подтверждается согласованностью цели и задач с заключением и рекомендациями производству. Экспериментальные данные получены при непосредственном участии соискателя и корректно проанализированы. По тексту диссертации прослеживается осуществление научного сотрудничества между диссертантом и научными организациями, такими, как ФГБНУ ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова», Московский физико-технический институт, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, ФИЦ Биотехнологии РАН, ИБХ РАН, РУДН и другие, в ходе которого диссертант смог еще более обогатить свою работу экспериментальным материалом и арсеналом использованных методов.

Значимость полученных результатов для науки и производства.

Проведена характеристика штаммов Psg и Cff, выделенных на территории РФ по ряду биологических признаков. Выявлены сорта сои, проявляющие устойчивость или реакцию сверхчувствительности при искусственном заражении возбудителями бактериозов. Разработанная диссертантом праймерная система ПЦР-РВ для идентификации Psg и Cff является дополнительным эффективным способом диагностики здоровья семян сои и может быть использована для научных исследований, экспресс-скрининга сои семеноводческими компаниями на заражённость Psg и Cff и, в случае валидации, рассмотрена для включения в методические рекомендации и применена в практической деятельности испытательных лабораторий в области аккредитации. Показана перспективность применения бактериофагов, растительных экстрактов и эфирных масел, комплекса наночастиц хитозана и меди и некоторых фунгицидов в защите сои от Psg и Cff. Результаты исследований используются в качестве обучающих

материалов при подготовке студентов направления «Агрономия» в ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева», а также могут быть использованы в дальнейших научных исследованиях и практической деятельности в области микробиологии и сельского хозяйства. К диссертационной работе приложены 2 акта внедрения полученных автором результатов.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации. Результаты диссертационной работы апробированы автором на 3 международных научных конференциях, они достаточно полно представлены в 14 опубликованных научных статьях, 2 из которых – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 9 – в изданиях, индексируемых в БД Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация Тараканова Р.И. имеет четкую логическую структуру, начиная с обоснования проблематики исследования и постановки цели и задач. Содержит ёмкий, дополненный умозаключениями автора обзор актуальной научной литературы по теме исследования, достаточно подробное описание детально спланированных и последовательно проведенных опытов, полученных результатов исследований и их анализ. На основании проведенных исследований, сделано заключение, которое подводит логичный и обоснованный итог многолетней работы автора; даны практические рекомендации. Работа изложена на 231 странице, состоит из введения, основной части (3-х глав), содержащей 53 рисунка, 19 таблиц, заключения, списка литературы (включает 327 наименований, в том числе 293 – на иностранном языке) и 12 приложений.

Оценка содержания диссертации.

Во введении обоснована актуальность, четко сформулированы цель и задачи исследований, определены теоретическая и практическая значимость полученных результатов, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

Глава 1 представляет собой обзор литературы и посвящена известным возбудителям бактериозов сои, первым упоминаниям о Psg и Cff, их номенклатуре и таксономии, географическому распространению, биологическим, биохимическим и генетическим характеристикам, особенностям патогенеза и симптомам вызываемых болезней сои, экономической вредоносности, способам распространения на дальние расстояния и в пределах поля, устойчивым к возбудителям сортам сои, методам идентификации Psg и Cff и мерам борьбы с ними.

В главе 2 дана общая характеристика методов, использованных в исследовании. Автором перечислены и подробно описаны все применяемые в работе методы, такие как изоляция чистых культур на питательных средах, выделение ДНК, ПЦР, ПЦР-РВ, секвенирование, построение дендрограмм генетических расстояний, спектрофотометрия, заражение растений с целью оценки вирулентности штаммов исследуемых бактерий, оценка расового состава штаммов, оценка чувствительности штаммов к гидроксиду меди и другим антибактериальным агентам, оценка вредоносности бактериозов сои в вегетационном опыте при искусственном инфекционном фоне, выделение фагов, экстракция эфирных масел и др. В работе использованы методы разносторонней характеристики штаммов исследуемых фитопатогенов, проведенные как в лабораторных, так и в полевых условиях. Самое положительное впечатление оставляет внушительный арсенал использованных методов и объем проведенных опытов. Особую ценность заслуживают подробная характеристика методов оценки эффективности исследованных веществ растительного происхождения, комплексов хитозана и бактериофагов и этапы создания мультиплексной системы диагностики возбудителей бактериальных болезней сои. При выполнении диссертационной работы, автор не только использовал существующие методы и подходы, но и специально оптимизировал ряд методов (например, определение оптимального способа выделения ДНК и состава ПЦР-смеси для идентификации патогенов) и разработал собственные тесты, позволяющие получить необходимые

данные, например, праймеры ITS-1_Psg/ITS-2_Psg для амплификации и последующего секвенирования ITS 16S-23S рРНК и праймеры AS-F/AS-R для обнаружения гена *alaS* у штаммов Cff. В работе Тараканов Р.И. использовал как штаммы всемирно известных коллекций фитопатогенов, в том числе типовые, так и собственные штаммы, выделенные им лично в ходе исследований.

В главе 3 рассмотрены результаты исследований видового разнообразия и мер диагностики и борьбы с бактериальными болезнями сои. Автором охарактеризованы 12 штаммов возбудителя бактериального ожога и 33 штамма возбудителя ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания сои; штаммы возбудителей выделены из семян и растений сои и других растений, имеющих происхождение в разных регионах РФ. Следует отметить глубокую характеристику штаммов как классическими биохимическими, микробиологическими и фитопатологическими, так и современными молекулярно-генетическими методами, что позволило создать полную картину популяций патогенов. Каждый полученный результат подкреплен статистической обработкой данных, иллюстративным материалом; по каждому результату автором сделаны логичные выводы. Впервые в РФ автором на сое выявлен возбудитель ржаво-бурой бактериальной пятнистости, о чем имеется соответствующая публикация. Разработана мультиплексная система ПЦР-диагностики, позволяющая с высокой специфичностью и чувствительностью проводить диагностику семенного материала сои на наличие Psg и Cff. Проведена характеристика 47 сортов сои, культивируемых в РФ, на восприимчивость к возбудителям бактериальных болезней и показана их сильная дифференциация по этому показателю, обнаружен ряд слабовосприимчивых сортов. Диссертант выделил и охарактеризовал 4 изолята бактериофагов, специфичных к штаммам-возбудителям бактериальных болезней сои и показал перспективность применения бактериофагов как биологического средства борьбы с бактериальными фитопатогенами. Автором показана перспективность

применения веществ растительного происхождения, комплекса наночастиц хитозана и меди и некоторых фунгицидов, а их эффективность достигала 80,6 %.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации, её основные результаты, заключение, включает список опубликованных научных работ в количестве 14 шт.

Вопросы и замечания к диссертационной работе. Наряду с несомненными достоинствами рассматриваемой диссертационной работы, по ней имеются следующие вопросы и замечания.

1. С. 49 почему для оценки видовой принадлежности бактерий рода *Pseudomonas* выбран порог идентичности 95 % при выравнивании нуклеотидных последовательностей ITS 16S-23S рРНК в BLAST? Насколько вариативен использованный участок для определения видовой принадлежности бактерий рода *Pseudomonas*?

2. С. 49, 64 почему Psg культивировали при температуре 18 °С, если оптимум составляет 24–26 °С (С. 20)?

3. С. 50 и далее по тексту – чем обусловлен выбор сорта сои Касатка для оценки вирулентности штаммов Psg и Cff? Имеет ли этот сорт свойства, сходные с сортами, используемыми в качестве дифференциаторов? Является ли сорт восприимчивым или, напротив, обладает устойчивостью? Почему для оценки вирулентности Cff выбран сорт фасоли Пурпурная королева? Является ли он восприимчивым?

4. С. 50 были ли одинаковыми (100 грамм) навески образцов как семян, так и растений для анализа? Действительно ли мацерацию растений в буфере проводили в течение 12 часов и не сказалось ли это негативно на состоянии пробы из-за чрезмерного размягчения тканей?

5. С 51. Для чего, при изоляции штаммов Cff, с полуселективной среды MSCFF культуры переносили еще на одну полуселективную среду SSM, и только затем на среду без селективных факторов?

6. Почему для выделения ДНК штаммов Psg (С. 48) и при выделении ДНК из штаммов для оценки специфичности (С. 61) использовали набор «Проба-ГС», а для Cff – «ФитоСорб» (С. 51)?

7. С. 88 не вполне удачно оформлена таблица 4. Исходя из содержания таблицы, столбец «растение-хозяин» было бы правильнее назвать «источник», а столбец «источник» – «происхождение».

8. С. 93 Сделан вывод о различиях в агрессивности штаммов Psg к растениям сои, хотя более корректно было бы указать, что имеются различия в отношении сои сорта Касатка, так как в опыте использовался именно этот сорт. То же, но про Cff – С. 104.

9. С. 98, 99 – типовой штамм Cff обозначен как LMG 3645, на С. 100 – С001, а по остальному тексту диссертации используется номер CFBR 3418. Понятно, что речь об одном и том же штамме, но было бы лучше указывать номер какой-либо одной коллекции или давать дополнительную информацию в скобках для простоты восприятия.

10. С. 102 – почему именно 390 ppm был выбран в качестве концентрации, делящей устойчивые и чувствительные штаммы?

11. В защите растений от болезней большое внимание уделяется периоду защитного действия пестицидов. Не проводил ли автор опытов, которые бы определили период защитного действия фагов?

Вопросы и замечания ни в коей мере не уменьшают значимости диссертационной работы Р.И. Тараканова.

Заключение. Диссертационная работа Тараканова Рашида Ислямовича на тему «Биологические свойства возбудителей бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости сои и меры защиты» является законченным научным трудом, в котором предложено решение научных и практических задач уточнения биологических свойств возбудителей бактериального ожога, ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания, и усовершенствование приёмов защиты сои от них, имеющее значение для развития сельского хозяйства,

сельскохозяйственной микробиологии и обеспечения продовольственной и биологической безопасности Российской Федерации. По своей актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертация Тараканова Рашита Ислямовича на тему «Биологические свойства возбудителей бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости сои и меры защиты» отвечает критериям ВАК и соответствует требованиям пп. 9-14 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Тараканов Рашит Ислямович заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.3. Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений.

Официальный оппонент:

Словарева Ольга Юрьевна

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник – и.о. начальника научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»)



Словарева Ольга Юрьевна

Подпись Словаревой О.Ю. заверяю:

Заместитель директора



А.А. Соловьев

«28» мая 2024 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»)

Адрес: 140150, Россия, Московская область, г.о Раменский, р.п. Быково, ул. Пограничная, д. 32

Тел. +7 (499) 707-22-27

E-mail: vniikr@fsvps.gov.ru

Официальный сайт: <https://vniikr.ru/>