

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора сельскохозяйственных наук Зейрука Владимира Николаевича на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Кутузовой Ирины Алексеевны на тему: «Внутривидовая вариабельность фитопатогенных грибов *Colletotrichum coccodes* и *Helminthosporium solani*» по специальностям 03.02.03 – «Микробиология» и 03.02.12 – «Микология»

Картофель – одна из важнейших сельскохозяйственных культур в жизни населения России. Однако, по ряду объективных и субъективных причин урожайность и качество клубней «второго хлеба» остается невысоким. Одной из основных причин является поражение растений и клубней болезнями, среди которых значительный урон семенному и продовольственному материалу наносят опасные патогены – серебристая парша (*Helminthosporium solani* Dur. et Mont.) и антракноз (*Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes).

Актуальность темы диссертации

Решение задач продовольственной безопасности и обеспечение уровня жизни населения РФ, особенно в настоящее время, требуют разработки и внедрения новых технологий в сельское хозяйство. Результаты данной работы могут быть использованы при разработке системы мероприятий по защите картофеля и томата в период посадки и при хранении. В будущем полученные диссертантом данные помогут определять наиболее устойчивые районированные и перспективные сорта к изученным патогенам. Поэтому актуальность данной работы не вызывает сомнений.

Научная новизна.

Впервые проведено исследование внутривидового разнообразия штаммов *C. coccodes*, выделенных с семенных клубней картофеля из разных регионов России, Германии и Нидерландов. Исследована их устойчивость к наиболее применяемым в производстве фунгицидам.

Впервые в мире на основании анализов участков ДНК проведен сравнительный анализ штаммов из клубней, листьев, стеблей картофеля и томата. Также впервые изучено внутривидовое разнообразие *H. solani* на примере штаммов, собранных в разных регионах России и выделенных из импортированных семенных клубней. Показано наличие или отсутствие вариабельности по участкам ДНК различных изолятов.

Теоретическая и практическая ценность.

Автором приведены теоретические выкладки роли штаммового разнообразия *C. coccodes* и *H. solani* по независимым генетическим маркерным признакам и по данным культурально-морфологического анализа. С практической точки зрения важно то, что диссертантом выявлена высокая эффективность дифеноконазола и коллоидного серебра и что не обнаружено устойчивых к ним изолятов изучаемых патогенов. В то же время засвидетельствована высокая вариабельность полученных изолятов по устойчивости к азостробину и тиабендазолу. Поэтому автор рекомендует картофелеводам регулярную смену фунгицидов, а также проведение оценки доли устойчивых изолятов или штаммов в семенном материале.

Апробация работы и публикации.

Материалы диссертации были представлены на 7 научных российских и международных мероприятиях

Основные результаты диссертации опубликованы в 13 печатных работах, из них 3 статьи в журналах, входящих в базы WoS и Scopus, 2 статьи в журналах, входящих в ядро РИНЦ (RSCI), 8 – в других периодических изданиях и сборниках.

Связь работы с государственными программами

Работа по сбору, выделению и анализу образцов *C. coccodes* частично была поддержана грантом РФФИ № 15-29-02512 офи_м; секвенирование образцов выполнялось при частичной поддержке гранта РНФ №14-50-00029.

Степень достоверности.

Исследования выполнены на современном оборудовании с использованием общепринятых и адаптированных для данной работы методов и методик.

Положения, выносимые на защиту.

На защиту вынесены основные результаты проведенных экспериментов, которые полностью раскрывают сущность выполненной работы, ее глубину и направленность. Для оценки достоверности полученных результатов использованы стандартные статистические методы.

Общая оценка работы.

Работа написана неплохим литературным языком, хорошо уже сформировавшимся специалистом, прекрасно оформлена. Обоснована актуальность, новизна, теоретическая и практическая значимость поставленной диссертантом проблемы.

Личный вклад автора заключается в проведении экспериментальных исследований, результаты которых отражены в диссертации. Они получены лично автором или при его непосредственном участии. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов, методов и методик, результатов исследований, их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка публикаций по теме диссертации и списка использованной литературы.

Материалы изложены на 140 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц, 36 рисунков. Список литературы включает 121 источник, в том числе работ иностранных авторов 88.

В главе 1 автор провел глубокий и всесторонний анализ состояния поставленной проблемы. Детально рассмотрены основные грибные болезни картофеля, приведены ежегодные потери от них урожая. Дана характеристика болезней, вредителей и сорной растительности.

Особое внимание уделено несовершенному грибу *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes, который поражает 35 растений-хозяев из 13 семейств. Диссертант приводит в обзоре источники первичной инфекции этого гриба.

Автором работы детально рассмотрены причины появления болезни, её диагностика, визуальное проявление, ущерб наносимый урожаю картофеля. В диссертации соискатель приводит культурально-морфологические характеристики гриба *C.coccodes*. Особенно важно утверждение автора, что данный патоген встречается практически во всех регионах возделывания картофеля и что инфицирование им происходит во все периоды возделывания и хранения «второго хлеба».

Также, аналогично и детально рассмотрен и второй патоген – возбудитель серебристой парши клубней картофеля (*Helminthosporium solani*). Это особенно важно для картофелеводов, так как данная болезнь начала широко распространяться в РФ после завоза в страну импортного картофеля, прежде всего из Нидерландов. Это подтверждают экспериментальные данные интродукционного питомника ВНИИКСХ, полученные в 1980-83 гг. Важно и то, что на основании литературных данных автор свидетельствует, что основным источником первичной инфекции является мицелий и споры на пораженных клубнях, с сохранением их в почве и хранилище.

Диссертант обращает особое внимание на то, что обработка фунгицидами или даже посадка здоровым семенным материалом не гарантирует от поражения серебристой паршой клубней нового урожая. Инокулом может сохраняться и в пустом хранилище. Споры *H.solani* сохраняются в пеноизоляции.

Кутузовой И.А. очень хорошо изложен химический метод защиты, с классификацией пестицидов, методов защиты, их основных групп, подвижности, токсичность, характеристики и классификация их действия на возбудителей.

Глава 2. Материалы и методы.

Автором приведена методика выделения в чистую культуру изучаемых патогенов, опубликован состав питательных сред.

Приведено происхождение и характеристики изолятов *H.solani*, дан их анализ и общий список, полученных из отечественного и импортного семенного картофеля на протяжении 2013-2017 гг. Проведена амплификация штаммов *H.solani* с видоспецифичными праймерами Hs1NF1/ Hs2NR1. Протестировано 22 изолята на устойчивость к препаратам Текто, Скор, Квадрис и Зерокс.

Аналогичная исследовательская работа проведена с изолятами *S. coccodes*. Опубликован общий список российских и европейских штаммов. Амплификация штаммов *S. coccodes* для уточнения видовой принадлежности проведена с праймерами Cc1NF1/Cc2NR1. Секвенирование маркерных участков генома проведено у 51 изолята; на устойчивость к фунгицидам Зерокс, Текто, Максим, Престиж, Квадрис и Скор протестированы 44 изолята.

Выделение ДНК выполнено соскателем по модифицированной методике (Griffith, Shaw, 1998, Kutuzova et al., 2017). Автором подробно изложено проведение ПЦР и секвенирование маркерных последовательностей ДНК.

Кутузовой И.А. дано описание используемых в исследованиях шести фунгицидов с различными действующими веществами.

Исследования скорости роста и морфологических признаков 55 штаммов *C. coccodes* проведено на двух средах: сусло-агаре и картофельно-декстрозном агаре. Автором дано детальное описание этих методик.

Все полученные данные обработаны стандартными статистическими методами.

Глава 3. Результаты и обсуждение.

Работа основана на проведении лабораторных и полевых обследований. Проанализированные 55 штаммов *C. coccodes* диссертант разделил на 4 морфологические группы: А, В, С и D и охарактеризовал их по внешнему виду, особенностям роста и цвету колоний.

Все 4 группы представлены только в Московской области и Германии. В каждом изучаемом регионе выделена доминирующая морфологическая группа. Штаммы, выделенные с листьев и стеблей обладали большей макро- и микроморфологической однородностью по сравнению с изолятами из кожуры клубней. Соискатель обнаружил, что на стеблях существует один тип спор, тогда как на листе существует 2 типа спороношения.

Была исследована скорость роста штаммов *C. coccodes* при температурах 5°C, 15°C, 24°C и 33°C. Результаты, полученные Кутузовой И.А., доказывают, что лучше всего колонии изолятов или штаммов растут при $t = 24^{\circ}\text{C}$, медленнее $t = 15^{\circ}\text{C}$. Однако, существенной разницы не обнаружено. Значительная разница в росте зафиксирована при $t=5^{\circ}\text{C}$ и $t=33^{\circ}\text{C}$.

Для выявления видовой принадлежности и внутривидовой вариабельности *C. coccodes* диссертантом были определены последовательности нуклеотидов участков ДНК: ITS1-5,8S-ITS2(ITS), генов актина, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GD), глутамин-синтетазы (GS). Последовательности изучены у 42-48 штаммов.

Автор доказывает, что все последовательности 44 штаммов по гену актина были одинаковыми. По ITS исследуемые штаммы разделились на 2 группы.

Кутузова И.А. при помощи эксперимента с последовательностями гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы констатирует, что у 47 штаммов с картофеля существует 2 группы, различающиеся двумя нуклеотидами. Автор депонировал их сиквенсы в Genbank. Также обнаружено, что томатные штаммы отличались от картофельных заменой 6-ти нуклеотидов.

По последовательности гена глутамин-синтетазы 42 штамма диссертант разделил на 2 группы, отличающиеся двумя нуклеотидами. Штаммы, выделенные из листьев оказались в одной группе. Также картофельные штаммы отличались от томатных.

Кутузовой И.А. проведена большая работа по определению последовательностей нуклеотидов ядерных рибосомных генов и межгенных спейсеров (ITS1-5,8S-ITS2) у 27 коллекционных штаммов *H. solani*.

Соискатель доказывает, что внутривидового разнообразия по структуре данного участка не выявлено. Последовательности всех исследуемых штаммов были типичными для *H. solani*. Таким образом, автор доказал высокую гомогенность этого вида патогена по исследуемому участку генома.

Особый практический интерес вызывает работа по изучению устойчивости штаммов *C. coccodes* к применяемым в настоящее время в картофелеводстве фунгицидам. Высоким фунгицидным действием обладали дифеноконазол (препарат Скор) и коллоидное серебро (препарат Зерокс). Препараты на основе тиабендазола (Текто), азоксистробина (Квадрис) и флудиоксонила (Максим) оказывали также фунгистатический эффект на штаммы *C. coccodes*. И лишь пенцикурион (Престиж) оказался неэффективен в отношении этого гриба.

Аналогична работа проведена по устойчивости штаммов *H. solani* к тем же фунгицидам. Высокий фунгистатический эффект в отношении этого

патогена показали дифеноконазол, коллоидное серебро и азоксистробин. Через 25-30 дней инкубирования мицелий гриба при соединении с фунгицидом начинал расти очень медленно. Тиабендазол и азоксистробин также эффективно ингибировали рост большинства тестируемых штаммов. Однако автор выявил ряд устойчивых к ним штаммов. Следует отметить тот факт, что штаммы, выделенные из германского семенного материала, были восприимчивее к тиабендазолу, а среди российских и голландских были очень устойчивые.

Автор значительное внимание уделил препарату Зерокс на основе коллоидного серебра, способного обеспечить экологически безопасную защиту картофеля от ряда заболеваний.

Сравнивая эффективность изучаемых фунгицидов в защите от *S. coccoodes* и *H. solani* диссертант утверждает, что лишь пенцикурион оказался неэффективным в отношении обоих исследованных патогенов. Не было выявлено штаммов, устойчивых к дифеноконазолу и коллоидному серебру.

На наш взгляд, следует согласиться с мнением автора о необходимости проведения мониторинга встречаемости устойчивых штаммов в популяциях *H. solani* к тиабендазолу с использованием тестов на основе ПЦР, что значительно ускоряет эту работу.

В конце диссертационной работы приведено заключение на представленные материалы, которые согласуется с полученными результатами и литературным обзором.

Представлено 6 пунктов конкретных выводов.

Особенно важно, что имеются практические рекомендации, которые актуальны и полезны для современного картофелеводства.

Несмотря на выполненную в планируемом объеме диссертацию, ее целостность и конкретность, к ней есть некоторые замечания.

Замечания к работе.

1. В целях диссертации можно было добавить изучение биологических свойств патогенов. В работе такой материал имеется.
2. В диссертации приведены результаты изучения штаммов *C. coccodes*, выделенных с томата. Было бы хорошо дать практические рекомендации и для овощеводов.
3. Во введении хорошо было бы указать долю России в мировом производстве по валовому урожаю картофеля на 2016 или 2017 гг.
4. Раздел об актуальности работы присутствует во введении, но не выделен отдельным пунктом.
5. В разделе 1.1 идет описание вредителей и сорняков без ссылки на авторов (стр. 11).
6. Картофель не сеют, а сажают (стр. 13).
7. В борьбе с клубневыми инфекциями отсутствует описание физического метода и современных методов диагностики патогенов.
8. В работе заболевание, вызываемое *C. coccodes* на клубнях называется «Черная пятнистость». Мы больше привыкли к названию заболевания «Антракноз». В чем различие между этими заболеваниями?
9. Нет четкого определения термина «изолят» и «штамм» (пример табл. 2.1; 2.3; стр.59; 68).
10. Изоляты или штаммы не растут, а растут колонии гриба (стр. 64).
11. На рис. 3.10 обозначены изоляты, выделенные из листьев картофеля и плодов томата, но не обозначены выделенные с клубней картофеля (стр.76).
12. Отсутствует нумерация страниц 38, 61, 82, 84.

Закключение.

Несмотря на сделанные замечания актуальность избранной темы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна не вызывают

сомнения. Они не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова, к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспортам специальностей 03.02.03 – «Микробиология» и 03.02.12 – «Микология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Работа оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Кутузова Ирина Алексеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 – «Микробиология» и 03.02.12 – «Микология».

Официальный оппонент:

ст. научн. сотр., д. с.-х. н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства
им. А.Г. Лорха

заведующий лабораторией защиты,

Зейрук Владимир Николаевич

04 сентября 2018г.

Контактные данные:

тел.: 7(916)XXXXX157, e-mail: XXXXX@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 06.01.07 – «Защита растений»

Адрес места работы:

140051, Московская область, Люберецкий район, п. Красково-1, ул. Лорха, д.
23. Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного
хозяйства им. А.Г. Лорха» (ФГБНУ ВНИИХХ)

Тел.: 8(495)557-50-92; <http://vniikh.com>

Подпись сотрудника организации В.Н. Зейрука
удостоверяю:

Заведующий отделом кадров

ФГБНУ ВНИИХХ им. А.Г. Лорха

А. В. Иваницкий

