



УТВЕРЖДАЮ
Врио директора ФГБНУ
Всероссийского научно-исследовательского
института фитопатологии,
д. с.-х. наук
Алексей Павлович Глинушкин
« 25 » февраля 2016 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» на диссертацию Кокаевой Людмилы Юрьевны «МИКОБИОТА ПОРАЖЕННЫХ ЛИСТЬЕВ *SOLANUM TUBEROSUM* L., *S. LYCOPERSICUM* L. И *S. DULCAMARA* L», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.12 – микология

Актуальность темы исследований.

Диссертационная работа Кокаевой Людмилы Юрьевны посвящена изучению микобиоты пораженных листьев картофеля (*SOLANUM TUBEROSUM* L.), томата (*S. LYCOPERSICUM* L.), диких пасленовых (на примере *S. DULCAMARA* L) и разработке методов видовой идентификации некоторых фитопатогенных грибов с помощью ПЦР без выделения чистых культур.

Картофель и томат являются одними из важнейших сельскохозяйственных культур России. Однако болезни пасленовых, вызываемые грибами, грибоподобными организмами наносят значительный ущерб производству и приводят к существенным экономическим потерям. Так, в годы эпифитотий фитофтороза урожай томатов погибает полностью, а продуктивность картофеля нередко снижается в 1,5-2 раза.

В последние годы наблюдается интенсивный обмен семенным материалом внутри страны, не снижается импорт семян томата и клубней картофеля, кроме того, климатические изменения способствуют появлению новых и расширению ареалов существующих видов фитопатогенных грибов и оомицетов. В этой связи, для создания эффективных стратегий контроля патогенов необходимо разрабатывать современные методы быстрой и точной видовой идентификации. Традиционно используемые методы оценки на основе анализа культурально-морфологических признаков требуют выделения чистых культур исследуемых фитопатогенов и могут быть неэффективны в случае, если имеет место скрытое заражение (латентная инфекция).

В этой связи рассматриваемая диссертационная работа представляется актуальной, и, несомненно, имеет практический интерес.

Научная новизна работы.

В работе впервые проведено исследование комплекса грибов – возбудителей листовых пятнистостей растений из семейства пасленовых молекулярно-генетическими методами без выделения чистых культур. Применение подобных методов анализа позволило выявить в пораженных образцах листьев виды грибов, о нахождении которых на исследуемых растениях ранее в России не сообщалось.

Разработаны тест-системы для идентификации трех видов *Alternaria* sp. Их применение позволило выявить виды *A. alternata*, *A. solani* и *A. infectoria* в пораженных образцах листьев из разных регионов России. В исследованных образцах эти виды встречались как по отдельности, так и совместно.

Практическая значимость работы.

Несомненна и практическая ценность результатов работы. В работе был оптимизирован метод определения видового состава пораженных листьев молекулярно-генетическими методами без выделения чистых культур. Этот метод, основой которого является клонирование амплифицированных фрагментов ДНК с их последующим секвенированием, успешно дополняет существующие методы идентификации видовой структуры грибных сообществ и может быть использован при мониторинге видового состава фитопатогенных грибов и оомицетов.

Разработаны высокоспецифичные праймеры для классической ПЦР и ПЦР в реальном времени для идентификации трех видов *Alternaria* (*A. alternata*, *A. solani* и *A. infectoria*), вызывающих поражения разных органов растений из семейства пасленовых, различающихся по экологическим оптимумам и устойчивости к фунгицидам. В результате проведенной работы созданы тест-системы, которые могут применяться для экспресс-диагностики этих видов в образцах растительных тканей без выделения грибов в чистую культуру.

Объем и структура диссертации.

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, перечня публикаций по теме диссертации и списка литературы. Она изложена на 197 страницах машинописного текста, содержит 69 рисунков и 26 таблиц.

Список цитированной литературы состоит из 348 источников, в том числе 300 зарубежных авторов.

Апробация работы и публикации.

Основные результаты опубликованы в 21 печатной работе, из них 5 статей – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 10 – в других периодических изданиях, 6 – в сборниках тезисов и материалов конференций. Материалы были апробированы на 6 международных и 1 всероссийской конференции.

Методы работы и оценка достоверности полученных результатов.

Работа основана главным образом на результатах лабораторных экспериментов, выполненных с соблюдением всех основных требований. Полученные в результате экспериментов данные оценены на их статистическую достоверность с помощью программы Excel. Обоснованность изложенных в диссертации научных положений и выводов не вызывает сомнений. Текст автореферата соответствует основному содержанию диссертации.

Общая оценка работы.

Работа написана литературным языком, хорошо оформлена. Во введении Л.Ю. Кокаева достаточно обосновала общие направления своей работы, показала ее актуальность, новизну, практическую значимость. В работе использована литература по теме диссертации.

В первой главе автор подробно излагает современное состояние вопроса. В частности, приводит методы анализа видового состава фитопатогенных грибов, описания основных заболеваний картофеля и томата, методы выявления их возбудителей. Особое внимание уделяет рассмотрению молекулярно-генетических методов, используемых при идентификации фитопатогенных организмов и анализу сообществ грибов в пораженных органах растений.

Вторая глава посвящена изложению условий, материалов и методов исследований.

В третьей главе автор излагает в основном результаты исследований. Наиболее ценны из них следующие:

- В исследованных **образцах листьев картофеля** (*Solanum tuberosum*) с симптомами некрозов было выявлено 19 видов грибов и грибоподобных организмов (*Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Alternaria infectoria*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium tenuissimum*, *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium* sp., *Mycosphaerella* sp., *Phoma* sp., *Phytophthora infestans*, *Tolypocladium inflatum*, *Saccharomyces* sp., *Cryptococcus* sp., *Cryptococcus tephrensis*, *Dioszegia crocea*, *Hannaella oryzae*);

в листьях томата (*S. lycopersicum*) – 13 видов (*Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Cladosporium herbarum*, *Didymella lycopersici* (= *Phoma* sp.), *Neocamarosporium goegapense* (= *Phoma betae*), *Passalora fulva* (= *Cladosporium fulvum*), *Peyronellaea glomerata* (= *Phoma glomerata*), *Podosphaera fusca*, *Septoria lycopersici*, *Thanatephorus cucumeris* (= *Rhizoctonia solani*), *Candida albicans*, *Cryptococcus tephrensis*, *Dioszegia hungarica*);

в листьях паслена сладко-горького (*S. dulcamara*) – 16 видов (*Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium tenuissimum*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella* sp., *Pezizomycotina* (1), *Pezizomycotina* (2),

Phialophora sp., *Phoma herbarum*, *Phoma* sp., *Phytophthora infestans*, *Thielavia basicola*, *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus* sp.).

Обнаружено совместное присутствие нескольких видов потенциально патогенных грибов в пределах одного некроза. Максимальное количество видов в одном образце (листовой пластинке) составило 8 видов у картофеля, 8 видов у томата, и 7 видов у паслена.

- Установлено, что вид *Alternaria alternata* s.l. способен самостоятельно заражать листья картофеля и томата разных сортов, причем вирулентность и агрессивность изолятов в отношении разных сортов сильно варьирует.

- Разработаны системы быстрой диагностики для выявления видов рода *Alternaria*, возбудителей альтернариозов картофеля, томата и диких пасленовых, с помощью классической ПЦР и ПЦР в реальном времени. Установлено, что разработанные системы не дают ложноположительных результатов, обладают высокой специфичностью и чувствительностью.

- С помощью разработанных тест-систем в образцах листьев картофеля и томата были обнаружены виды *A. alternata*, *A. solani* и *A. infectoria*. Вид *S. coccodes* был выявлен в фиксированных образцах листьев всех исследуемых видов растений; в листьях томата и *S. dulcamara* в России он обнаружен впервые.

Замечания по диссертационной работе.

В представленной работе соискатель, к сожалению, не смог избежать ряда упущений и недостатков при планировании, проведении и оформлении работы.

В исследованных образцах листьев паслена сладко-горького (*S. dulcamara*) с симптомами некрозов было выявлено 16 видов грибов и грибоподобных организмов (на странице 105 приводится список), однако в выводах указано 19 видов.

Поскольку в последние годы паслен черный (*S. nigrum*) встречается повсеместно в посадках картофеля в различных регионах России, было бы правильнее отбирать пораженные образцы для исследований данного вида на производственных посадках картофеля, а не паслена сладко-горького (*S. dulcamara*) на территории Московского Университета имени М.В.Ломоносова (г. Москва, Воробьевы горы) вдали от посадок картофеля и томата. Полученная информация о поражаемости картофеля и паслена черного патогенами была бы более полезной, в том числе и для разработки эффективных стратегий защиты посадок картофеля от болезней.

В опытах, посвященных изучению вирулентности штаммов *Alternaria* sp. к сортам картофеля и томата, следовало бы при проведении эксперимента предусмотреть вариант с заражением листьев картофеля изолятом *Alternaria solani*, выделенного с листьев томата.

Для проведения молекулярно-генетических исследований патогенов, встречающихся на надземной части растений, следовало бы отбирать не только зараженные листья, но и стебли. Поскольку очень часто, схожие

Ведущая организация

По диссертационной работе Кокаевой Людмилы Юрьевны

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» (ФГБНУ ВНИИФ)

Адрес: 143050, Московская обл., Одинцовский район, р.п. Большие Вяземы, ул. Институт, владение 5.

В структуре института существует отдел болезней картофеля и овощных культур.

В отделе ведется научная работа по следующим направлениям: мониторинг фитосанитарного состояния посадок картофеля в России, изучение структуры популяций возбудителей болезней картофеля и томата, прогноз изменения агрессивности патогенов картофеля, мониторинг резистентности возбудителя фитофтороза картофеля, развитие систем интегрированной защиты картофеля от комплекса болезней и др., независимая оценка образцов растений, пораженных различными заболеваниями.

Сотрудники отдела являются авторами многих научных изданий, в том числе работы по теме исследований диссертационной работы.

Филиппов А.В.; Кузнецова М.А.; Рогожин А.Н. и др.

1. Filippov A.V., Kuznetsova M.A., Rogozhin A.N., Shirokova E.A., Kostjashov V.V. Resistance of potato plants to late blight activated by pre-planting treatment of tubers with specially formed low-frequency pulse electric field. International Symposium // Signalling Systems of Plant Cells. Moscow, Russia, 2001, June, 5-7. Onti, Pushchino, pp.18.
2. Филиппов А.В., Рогожин А.Н., Кузнецова М.А., Спиглазова С.Ю., Сметанина Т.И. «Оценка частичной (горизонтальной) устойчивости листьев картофеля к *Phytophthora infestans* (Mont.)dBy; вариации агрессивности изолятов патогенна из различных географических регионов» // Микология и фитопатология, 2004, №5, стр.74-88.
3. Filippov A.V., Gurevich B.I., Kozlovsky B.E., Kuznetsova M.A., Rogozhin A.N., Spiglasova S.Y., Smetanina T.I. Rapid method for evaluation of partial potato resistance to Late Blight. Aggressiveness of pathogen isolates originating from different regions of Russia.//Towards integration of late blight control in European potato production, breeding achievements and pathogen knowledge. January 14-18, 2004, Falenty, Plant Breeding and Acclimatization Institute (IHAR), P. 3.
4. A.V. Filippov, A.N. Rogozhin, M.A. Kuznetsova, N.V. Statsyuk, A. Ronis, and H.W. (Bud) Platt // Efficiency of the VNIIFBlight advice program as a fungicide-reducing tool in the potato late blight management *Zemdirbyste-Agriculture*, 2015 vol. 102, no. 4.
5. Филиппов А.В., Кузнецова М.А., Рогожин А.Н., Сметанина Т.И., Спиглазова С.Ю. Сроки обработки картофеля для защиты от фитофтороза, //Защита и карантин растений, 2006, №12, стр. 30-32.

6. Кузнецова М.А., «Болезни картофеля при хранении», Защита и карантин растений, 2006, №10, стр. 37-44.
7. Кузнецова М.А., «Защита картофеля», Защита и карантин растений, 2007, №5, стр. 42.
8. Кузнецова М.А., Козловский Б.Е., Козловская И.Н., Рогожин А.Н., Филиппов А.В. Особенности влияния препарата, содержащего фосфористую кислоту, на фитофтороз картофеля. Юбилейный сборник трудов «50 лет на страже продовольственной безопасности страны» Большие Вяземы, 2008г, стр.443-450.
9. M. Kuznetsova, S. Spiglazova, T. Smetanina, B.Kozlovsky, T. Derenko, A. Filippov// Effect of Quadris applied as an in-furrow spray against the late and early blights on a potato foliage// Proceedings of the Eleventh Euro Blight Workshop, Hammer, Norway 28-31 October, 2008.,pp.275-279. PPO-Special Report no. 13, July 2009, H.T.A.M. Schepers (editor), Applied Plant Research - Wageningen UR AGV Research UNIT.
10. M.A. Kuznetsova, T.I. Ulanova, A.N. Rogozhin, T.I. Smetanina, and A.V. Filippov // Significance of oospores in the overwintering of the late blight pathogen in Russia Schepers HTAM (ed.) PPO-Special Report no. 14, 223 - 230 (2010).
11. Кузнецова М.А., Козловский Б.Е., Рогожин А.Н., Сметанина Т.И., Спиглазова С.Ю., Деренко Т.А., Филиппов А.В.// Фитофтороз и альтернариоз картофеля: программа защитных действий. Москва, «Картофель и овощи», №3, 2010, стр.27-30.
12. Кузнецова М.А. //Надежность в любых условиях: доказано Евроблайт// Картофельная система, №1,2011г., стр.22-23.
13. М.А. Кузнецова, А.Н. Рогожин, Т.И. Сметанина, Л.Л. Дорофеева // Новое решение в защите картофеля от фитофтороза и альтернариоза, «Картофель и овощи», № 7. С. 24-26.