

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора сельскохозяйственных наук, старшего научного сотрудника, главного научного сотрудника отдела агротехнологий ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха» Зейрука Владимира Николаевича на диссертационную работу Васильевой Анны Андреевны «**Биологические свойства возбудителей черной ножки картофеля и меры защиты**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.3. Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений.

Оценка актуальности темы выполненной работы

Картофель – одна из важнейших сельскохозяйственных культур практически во всем мире, в том числе и в России. В последние годы, особенно в 2023 г., был отмечен рост урожайности этой культуры. Вместе с тем, картофель поражается большим количеством болезней, вредителей и сорняков, снижающих его продуктивность. Среди возбудителей болезней различают грибы, бактерии, вирусы, нематоды и виоиды.

Автор посвятил свою работу бактериозам картофеля: черной ножке и ассоциированной с ней мягкой гнили, которые вызываются различными видами пектолитических грамотрицательных энтеробактерий из родов *Pectobacterium* и *Dickeya*. Эти бактерии являются одним из наиболее вредоносных и приводят к значительным потерям урожая, достигающим 50% и более. В связи с этим, диссертант уделил особое внимание в своих исследованиях: видовому составу возбудителей в семенном материале, их биологическим свойствам, усовершенствованию методов диагностики, оценки степени устойчивости сортов и эффективности мер защиты картофеля с уклоном на их экологизацию. Таким образом, выбранная тема в настоящее время является актуальной, а ее цель и задачи сформулированы четко в соответствии с темой диссертации.

Степень разработанности темы

Теоретические и практические основы биологических особенностей возбудителей черной ножки исследуются многими учеными во всем мире. В

значительной степени изучено большое разнообразие патогенов, их вредоносность и распространенность, разработана диагностика. Однако, в последнее десятилетие в зарубежной литературе описываются новые виды фитопатогенных пектолитических бактерий, ранее не встречавшихся в РФ. Совершенствуются методы диагностики, появляются новые перспективные сорта и подходы к защите картофеля.

Научная новизна исследований и полученных результатов

При непосредственном участии автора проведены многолетние исследования, в результате которых был уточнен видовой состав возбудителей черной ножки и мягкой гнили в разных регионах РФ, определено преимущественное преобладание видов *P. versatile*, *P. brasiliense* и *P. caratovorum*. Диссертантом впервые на территории России обнаружен возбудитель черной ножки и мягкой гнили *Pectobacterium punjabense* и разработана диагностическая тест-система позволяющая его диагностировать.

Проведена большая работа по оценке клубневой и стеблевой устойчивости 16 сортов картофеля на заражение возбудителями черной ножки и мягкой гнили, выявлены сорта с комплексной устойчивостью к патогенам. В условиях *in vitro* доказано защитное действие фунгицида Ридомил Голд Р к возбудителям черной ножки картофеля. Проанализирована антибактериальная активность 25 образцов эфирных масел и 7 образцов водных и этанольных растительных экстрактов по отношению к бактериям из родов *Pectobacterium* и *Dickeya*, в результате чего для некоторых из них выявлена профилактическая и лечебная эффективность в защите клубней картофеля.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в том, что при постановке опытов на искусственном инфекционном фоне были обнаружены сорта картофеля, имеющие комплексную устойчивость к возбудителям черной ножки и мягкой гнили клубней. Установлена высокая чувствительность и видоспецифичность метода ПЦР-диагностики пригодного

для обнаружения различных штаммов возбудителя черной ножки *Pectobacterium punjabense*. Доказана перспективность применения бактериофагов, эфирных масел, растительных экстрактов и медьсодержащих фунгицидов в защите картофеля от черной ножки.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В диссертационной работе автором детально описана методология исследований. Она полностью адекватна поставленным задачам и согласуется с современными методиками. Материалы исследований, полученные при непосредственном участии соискателя, корректно проанализированы и обоснованы результатами статистической обработки с применением методов дисперсионного анализа. Выводы и рекомендации сформулированы на основе тщательно спланированных и проведенных на большом экспериментальном материале исследований. Диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной проблемы и представляет собой целостное научное исследование, что подтверждается согласованностью цели и задач с заключением и рекомендациями производству. Публикации по теме исследования подтверждают достоверность результатов, представленных в диссертации, а автореферат соответствует основному содержанию и полностью отражает суть диссертационной работы.

Личный вклад соискателя

Диссертация выполнена лично автором в период обучения в аспирантуре. В процессе этого срока получены оригинальные результаты лабораторных и вегетационных опытов. Диссертантом выполнен основной объем работы самостоятельно, а частично совместно с авторами публикаций. На основе полученных данных подготовлены к печати научные публикации, оформлена диссертация, автореферат и соответствующая документация.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

По материалам работы опубликовано 8 работ, в том числе одно свидетельство о государственной регистрации баз данных и 3 публикации в рецензируемых научных изданиях, включенных в перечень ВАК РФ и одна в издании, входящем в систему цитирования Scopus и Web of Science. Апробация работы проведена на Всероссийском конгрессе по защите растений, международных и всероссийских научных конференциях.

Оценка содержания диссертации

Работа изложена на 202 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, экспериментальной части, заключения, рекомендаций производства и списка литературы. Имеет 19 таблиц, 45 рисунков, 338 литературных источников, в том числе 256 иностранных.

В обзоре литературы автором отмечается важность проводимых исследований по изучению распространения и вредоносности черной ножки картофеля. Детально, с историческим подходом, проведен анализ литературных источников, описано систематическое положение возбудителей, смена доминирующих видов по годам, открытие новых генетических групп.

Васильевой А.А. четко обозначены причины активного распространения возбудителей болезни, различия в их вирулентности и эндофитной и эпифитной сохранности. Автор обращает внимание на наличие пектолитических бактерий в пресноводных водоемах всего мира, их жизнеспособности и путях распространения. Освещена гипотеза, что и насекомые, нематоды и брюхоногие моллюски могут служить альтернативными переносчиками патогенов. Описаны биологические свойства возбудителей черной ножки картофеля и типичные симптомы болезни со ссылками на многочисленные публикации отечественных и иностранных авторов. Значительное внимание уделено диагностике черной

ножки и мягкой гнили картофеля от выделения в чистую культуру на селективных средах до молекулярно-генетических методов дифференциальной диагностики.

Соискателем проделана большая работа с литературой по проблеме разработки стратегии защиты картофеля от возбудителей черной ножки. Прежде всего отмечается необходимость соблюдения национальных стандартов и профилактических приемов при возделывании семенного картофеля. Большая роль отводится сорту картофеля, предшественникам, оптимальному соотношению удобрений, микроэлементов и всем основным приемам технологии возделывания. Васильева А.А. указывает, что в связи с ужесточением законодательства, ограничено применение ряда препаративных форм пестицидов, однако, некоторые из разрешенных препаратов обладают бактериостатическими свойствами по отношению к пектолитическим бактериям. Также, диссертант выдвигает перспективное направление в борьбе с бактериозами – использование эфирных масел и экстрактов растений, затронута и роль средств защиты на основе нанотехнологий. Описаны перспективы использования непатогенных штаммов в качестве антагонистов, даются ссылки на зарегистрированные отечественные и зарубежные препараты. Большое значение придает Васильева А.А. использованию бактериальных вирусов – бактериофагов, ввиду их нетоксичности для человека и его окружения.

В заключении литературного обзора подчеркивается, что в настоящее время эффективных мер борьбы с бактериозами не найдено. Следует соблюдать санитарно-гигиенические и агротехнические мероприятия, а также следовать принципам интегрированной системы защиты картофеля.

Во второй главе детально описаны все этапы исследований, представлены материалы и методы, используемые автором при выполнении работы. Подробно описаны схемы выделения штаммов патогенов, согласно общепринятым методикам с модификациями. Детально обоснована методика проведения оценки биологических свойств возбудителей черной ножки

картофеля. Представлены этапы молекулярно-генетической характеристики штаммов с указанием используемых наборов праймеров, реагентов, оборудования, принципа секвенирования, анализа и визуализации результатов. Описаны методы оценки чувствительности и специфичности разработанной диагностической тест-системы на основе ПЦР-РВ. Освоена методика скрининга антибактериальной активности медьсодержащих фунгицидов в исследованиях *in vitro*. Автором детально описана методика оценки бактерицидных свойств фунгицида Ридомил Голд Р на искусственных инфекционных фонах. Диссертантом представлены различные методики оценки антибактериальных свойств эфирных масел и растительных экстрактов, а также бактериофагов для защиты картофеля от возбудителей мягкой гнили. Приведена методика оценки устойчивости 16 сортов картофеля, различных по группам спелости, к трем видам пектолитических бактерий. Описаны методы статистического анализа данных, применяемые при выполнении диссертационной работы.

Третья глава диссертации посвящена результатам проведенных исследований. Диссертантом было выяснено географическое распространение популяций патогенов по различным регионам РФ. По результатам ПЦР-диагностики с классическими родоспецифическими праймерами, а также диагностической системы «Фитоскрин» на основе ПЦР-РВ для дифференциальной диагностики патогенов диссертант определил в род *Pectobacterium spp* 56 изолятов. Выяснено, что черная ножка и мягкая гниль присутствует на территории 9 субъектов РФ (Московская, Кемеровская, Тверская, Томская, Омская обл. и т.д.), с явным преобладанием видов *P. versatile*, *P. brasiliense* и *P. carotovorum*. На основании полученных Васильевой А.А. данных секвенирования изолятов по гену *qurB*, с применением метода максимального правдоподобия построено филогенетическое дерево, включающее в себя 6 видов *Pectobacterium spp.*, в том числе вид *P. punjabense* впервые обнаруженный на территории РФ.

Соискателем тщательно отработана характеристика биологических свойств возбудителей черной ножки картофеля из рода *Pectobacterium*. Особенно это важно для недавно описанных видов, которые, несмотря на свою патогенность для картофеля, остаются недостаточно изученными, таких как *P. punjabense*, что и являлось одной из основных задач автора работы. Васильева А.А. доказывает, что несмотря на общее сходство биохимических особенностей, характерных для рода *Pectobacterium*, штаммы *P. punjabense*, хоть и с некоторой вариабельностью, но отличаются от других видов данного рода. В конечном счете автор констатирует, что использование биохимических тестов не может быть пригодно для дифференциации штаммов *P. punjabense*, хотя представляет научный интерес для сравнительной оценки внутри вида.

Новаторским в РФ можно считать разработанную диссертантом диагностическую тест-систему, позволяющую дифференцировать штаммы, принадлежащие к *P. punjabense*. Следует подчеркнуть, что разработанная система анализа может быть использована при мониторинге данного вида с применением методов классической ПЦР и ПЦР-РВ.

С целью разработки методов защиты картофеля от возбудителя черной ножки соискателем был проведен скрининг медьсодержащих фунгицидов. Так, при испытаниях *in vitro*, добавление фунгицида Ридомил Голд Р в питательную среду в концентрации 0,28 г/л и более препятствовало росту колоний штамма возбудителя *Dickeya chrysanthemi*. Последующее снижение д.в. фунгицида до 0,14 г/л приводило к бактериостатическому эффекту. В то же время Курзат Р оказался менее эффективным, лишь при д.в. 6,9 г/л наблюдалась 100% биологическая эффективность фунгицида. В работе также были выяснены возможные пути передачи инфекции за счет механического контакта больных листьев со здоровыми, капельным путем и оценена сохранность патогенов на поверхностях орудий труда. Доказано, что варианты опытов с предварительной обработкой листьев и стеблей картофеля Ридомил Голд Р отмечаются снижением интенсивности поражения по сравнению со

стремительно развивающейся мацерацией листовых пластин и стеблей картофеля в контроле. При этом результаты, полученные в лабораторных условиях, совпадают с результатами экспериментов, проведенных в теплице на искусственном инфекционном фоне.

Диссертантом проделан большой объем работ по использованию эфирных масел и растительных экстрактов в защите картофеля от возбудителей черной ножки. В результате первичного скрининга антибактериальной активности из 25 эфирных масел и 7 экстрактов минимальные концентрации, ингибирующей рост бактерий, показали лишь эфирные масла душицы обыкновенной, коричника китайского и гвоздичного дерева. Дальнейшая оценка выявила высокую антибактериальную активность растительных этанольных экстрактов бадана толстолистого и дуба обыкновенного. Антибактериальные свойства эфирных масел в защите клубней при лечебном применении наилучшим образом проявлялись при концентрации от 40 мг/мл, а для растительных экстрактов требовалась концентрация от 150 мг/мл. Заслуживают внимание результаты влияния эфирных масел и экстрактов на глубину мацерации клубней. Даже при применении масел в концентрации 10 мг/мл глубина проникновения мацерации на обработанных веществами растительного происхождения клубнях была ниже, чем в контрольном варианте. В ряде вариантов отмечается отсутствие мацерации клубней картофеля при их предварительной обработке.

Васильевой А.А. проведены исследования по влиянию бактериофагов в защите картофеля от различных штаммов 7 видов патогенов *Pectobacterium* и *Dickeya*. Выяснено, что их применение способствовало снижению диаметра мацерации на ломтиках картофеля по сравнению с контрольным вариантом, а при некоторых вариантах обработки, даже снижению диаметра пораженной ткани клубня до нуля.

На наш взгляд, автор работы верно формулирует, что наиболее перспективным направлением защиты от бактериальных патогенов является устойчивый сорт. При этом, проведенные опыты показали, что устойчивость

сорта сильно варьирует от изменения температурного режима, продолжительности эксперимента и видового состава патогенов, отличающихся по своей агрессивности. Таким образом, диссертант доказывает, что для достоверной оценки устойчивости сортов необходимо использовать патогены различной видовой принадлежности. На основании полученных результатов исследователь отнес к устойчивым к мягкой гнили клубней, вызванной наиболее агрессивным штаммом F004 (*P. atrosepticum*), сорта Удача, Варяг и Красавчик, а ко всем трем изучаемым патогенам - сорта Красавчик и Удача. По результатам оценки среднего балла поражения вегетирующих растений, инокулированных суспензиями патогенов, относительная устойчивость к штамму F004 была отмечена у сортов Шарвари пирожка, Винета, Ред Скарлетт, Жуковский ранний и Красавчик, при этом наибольшей устойчивостью ко всем трем штаммам обладали сорта Жуковский ранний и Красавчик. Соискателем также было отмечено, что расчет коэффициента линейной и ранговой корреляции не подтвердили зависимость между устойчивостью сорта при клубневой оценке и стеблевой устойчивостью, что доказывает необходимость проведения параллельного анализа по обоим признакам для получения достоверных данных об устойчивости сортов.

В заключении диссертации соискателем были сформулированы 6 пунктов основных выводов работы, отвечающих содержанию представленной диссертации и соотносящихся с поставленными автором целью и задачами исследований. Разработанные рекомендации имеют теоретическое и практическое значение для селекционеров-картофелеводов и фитопатологов при диагностике бактериозов.

Замечания и вопросы

Наряду с несомненными достоинствами рассматриваемой диссертационной работы, по ней имеется ряд следующих **замечаний и предложений**:

1. Автором была проделана большая аналитическая работа при формировании литературного обзора к диссертации. Предлагается опубликовать теоретическую часть работы в виде отдельной брошюры для будущих исследователей. Несмотря на внушительный объем современных иностранных источников рекомендуется расширить список классической отечественной литературы.

2. Автору надо четко определиться с терминами: изолят, штамм, вид, род, патогенность, агрессивность, вирулентность в сочетании с современной классификацией и избегать взаимоисключающих рассуждений (с. 17, 23, 26, 27, 28, 97, 100, 101, 102, 105, 107, 108, 111, 117, 155).

3. Дать обозначение знаков, размерности величин 43,5 и (с. 105), 0,02 нг/мл (с. 114), 500 п.н. (с. 111).

4. В работе имеются редакционные и грамматические ошибки (в оглавлении результаты работы должны соответствовать с. 91, а не с. 81; на с. 73 на рисунке плохо читается буква А; на с. 91 в 3-м абзаце «около 60 изолятов», а надо «56 изолятов»; на с. 108 в 3-м абзаце опечатки, должно быть «молекулярно-генетическая характеристика...проведенная»; на с. 115 в 1-м абзаце должно быть «подразумевает», а не «подразумевается»).

5. Не всегда пишется рядом черная ножка и мягкая гниль (с. 40, с. 84, с. 147).

6. В обзоре литературы дается рекомендация, что надо проводить 2 фитопрочистки, а правильно 3 фитосортопрочистки (с. 43-44).

7. Указать кто разработал праймеры (с. 111).

8. В заключении надо объединить черную ножку и мягкую гниль (в 1-м пункте они пишутся вместе, а во 2-м – только мягкая гниль, аналогично пункты 5 и 6).

9. В рекомендациях – пункт 1 упомянута только черная ножка, нужно добавить и мягкую гниль. Автор рекомендует тест-систему для диагностики штаммов или также изолятов?

Все высказанные замечания и предложения не затрагивают основных положений и выводов диссертации и несут, в основном, дискуссионный или рекомендательный характер, нисколько не снижая общего положительного впечатления от работы Васильевой А.А.

**Соответствие диссертации требованиям Положения ВАК РФ о порядке
присуждения ученых степеней**

Диссертация Васильевой Анны Андреевны «Биологические свойства возбудителей черной ножки картофеля и меры защиты» представляет собой законченное научно-квалификационное исследование, выполненное на актуальную тему, в котором предложено решение научных и практических задач усовершенствования приёмов мониторинга и защиты картофеля от наиболее вредоносного бактериального заболевания. Диссертационная работа по своей актуальности, новизне и научно-практической значимости полностью отвечает требованиям п.п. 9, 10, 11, 13 и 14, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положения о присуждении ученых степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, а ее автор, Васильева Анна Андреевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.3. Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений.

Официальный оппонент:

Доктор сельскохозяйственных наук (специальность 06.01.07 – защита растений, 2015 год), старший научный сотрудник, главный научный сотрудник отдела агротехнологий ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха» _____ В.Н. Зейрук
«20» ноября 2024 г.

Подпись Зейрука В.Н., заверяю: _____
Ученый секретарь ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха» _____ К.В. Аршин

ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха». Адрес: 140051, Московская обл., г. Люберцы, д.п. Красково, ул. Лорха, д. 23, литер Б;
тел/факс (498)645-03-03, e-mail: coordinazia@mail.ru, <https://potatocentre.ru>.