

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Гомжиной Марии Михайловны  
**"ФОМОИДНЫЕ ГРИБЫ НА ПОДСОЛНЕЧНИКЕ И БЛИЗКО-РОДСТВЕННЫХ  
СЛОЖНОЦВЕТНЫХ РАСТЕНИЯХ В РОССИИ",**

представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.12. Микология

Подсолнечник - самая популярная и рентабельная в производстве масличная культура в России. Поражение грибными болезнями - одна из основных причин снижения урожая и выхода масла. В работе рассмотрены фомоидные грибы - опасные патогены подсолнечника, вызывающие такие вредоносные заболевания, как фомоз и фомопсис. Резерватами болезней подсолнечника могут являться дикорастущие сложноцветные растения. В диссертации предпринято изучение фомоидных патогенов не только подсолнечника, но и близкородственных видов растений. К настоящему времени в России исследований фомоидных грибов проводилось недостаточно, информация о биоразнообразии и распространении фомоидных грибов, ассоциированных с подсолнечником и сорными сложноцветными, отрывочна, содержит немало неточностей и не систематизирована.

**Актуальность и научная новизна** работы М.М. Гомжиной заключается в том, что впервые на территории России с применением методов молекулярной филогении исследовано разнообразие фомоидных грибов – патогенов подсолнечника и дикорастущих сложноцветных растений. Впервые на этих растениях обнаружены виды *Diaporthe gulyae*, *D. phaseolorum*, *D. eres*, *Didymella glomerata*, *Stagonosporopsis heliopsisidis*. Уточнено географическое распространение возбудителей фомоза и фомопсиса подсолнечника. Благодаря данной работе ушло в прошлое мнение о том, что на территории России повсеместно распространены два вида фомоидных грибов, вызывающих серьезные заболевания подсолнечника - *Plenodomus lindquistii* и *Diaporthe helianthi*.

**Практическая значимость** работы состоит в том, что изучено видовое разнообразие и реконструирована молекулярная филогения грибов, ассоциированных не только с подсолнечником, но и с дикорастущими сложноцветными. Симптомы, вызываемые видами фомоидных грибов, являются сходными, поэтому проводить определение этих видов только по внешним признакам заболевания невозможно. Автор сконструировал ПЦР-праймеры для идентификации вида *P. lindquistii*, а также пару праймеров для избирательной амплификации и последующего секвенирования ITS-локуса рДНК фомоидных грибов в тотальной ДНК, выделенной из образцов поражённых растений. Особенно хочется отметить большую работу автора по оптимизации выделения ДНК из поражённых образцов растений и по подбору условий ПЦР.

**Диссертационная работа состоит из** введения, обзора литературы, 5 разделов экспериментального материала, содержащих описание материала и методов исследования, результатов, их обсуждения, заключения, 3 приложений, списка цитированной литературы. Работа изложена на 121 странице, содержит 45 рисунков, 14

таблиц. Список цитированной литературы включает 177 источников, в том числе 139 работ на иностранных языках.

Во **введении** обоснована актуальность темы исследования. Представлены цель и задачи, основные положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследований, степень достоверности и апробация результатов.

В **обзоре литературы** представлены данные о биоразнообразии, распространении и вредоносности фомоидных грибов – патогенов подсолнечника: возбудителя фомоза *P. lindquistii* и 12 видах рода *Diaporthe*, являющихся возбудителями фомопсиса. Представлена история изучения фомоидных грибов, эволюция взглядов на их систематику и таксономию, приведена современная система, основанная на молекулярной филогении. Показано, что морфологическая концепция рода и видов фомоидных грибов несостоятельна, а приоритетной является молекулярно-генетическая концепция, согласно которой фомоидные грибы, в широком понимании, занимают своё место в составе двух классов сумчатых грибов, шести порядков, 20 семейств и более чем 60 родов.

В главе **Материалы и методы** описаны использованные в работе изоляты фомоидных грибов, места сбора пораженных образцов растений и использованные гербарные образцы. Детально описаны методы выделения штаммов грибов в чистые культуры, анализ морфологических признаков, экстракция ДНК, проведение ПЦР и секвенирования, анализ результатов секвенирования. Особое внимание уделено методам инокуляции растений изучаемыми штаммами грибов и учету результатов. Все методы описаны подробно, приведенных сведений достаточно, чтобы их оценить и при необходимости повторить.

В **главе 3** описана разработка и оптимизация молекулярно-генетических методик идентификации фомоидных грибов. Уделено внимание оптимизации методики выделения ДНК из гербарных образцов фомоидных грибов, оптимизация протокола амплификации для качественной оценки результатов экстракции ДНК и последующего секвенирования, конструированию и тестированию специфичных праймеров. Особо хочется отметить практически важную работу по созданию праймеров Did2F/Did2R, специфично амплифицирующих ITS-локус рДНК фомоидных грибов семейства *Didymellaceae*. В дальнейшей работе эти праймеры были использованы для амплификации и последующего секвенирования ITS-локусов грибов данного таксона. Также была разработана пара праймеров Lep1F2иLep1R2, которые могут быть рекомендованы для идентификации возбудителя фомоза подсолнечника *P. lindquistii*.

В **главе 4** описана проведенная автором идентификация изолятов фомоидных грибов, выделенных с подсолнечника. Исследованы 187 изолятов фомоидных грибов (183 – из стеблей и 4 – из семян). По морфологическим и молекулярным признакам 177 изолятов были идентифицированы как *P. lindquistii*, восемь изолятов – как виды рода *Diaporthe* (*Diaporthe gulyae*, *D. phaseolorum*, *D. eres*), два - *Didymella glomerata*. Таким образом показано, что в России с подсолнечником ассоциированы несколько видов рода *Diaporthe*. Впервые на подсолнечнике обнаружены виды *D. phaseolorum*, *D. gulyae* и *D. glomerata*.

В главе 5 описана работа по идентификации фомоидных грибов, ассоциированных с дикорастущими растениями семейства *Asteraceae*. Особый интерес представляет идентификация фомоидных грибов из Микологического гербария ФГБНУ ВИЗР (LEP). Морфологические структуры грибов со временем разрушаются и не могут быть использованы для анализа, однако ДНК грибов способна сохраняться длительное время и может быть использована для молекулярно-генетического анализа. По морфологическим признакам сохранившихся для изучения структур грибов микромицеты из 6 образцов растений были определены до уровня вида, из 7 – до уровня рода и из 15 – до секции (группы родов). ПЦР и амплификация региона ITS позволили определить видовую принадлежность 9 гербарных образцов фомоидных грибов. Интересно, что молекулярные данные и морфологические признаки согласовались только для образца LEP 129311 возрастом 124 года. Большая работа была проведена по идентификации изолятов фомоидных грибов, выделенных из поражённых дикорастущих растений семейства *Asteraceae*. По морфологическим признакам исследованные 29 изолятов были отнесены к 21 виду из 6 секций рода *Phoma*. В результате проведённого филогенетического анализа после определения последовательностей ITS-локуса, LSU-области рДНК и гена  $\beta$ -тубулина, исследованные изоляты относились к 13 видам из 6 родов семейства *Didymellaceae* порядка *Pleosporales*. Виды *D. macrophylla* и *S. heliopsidis* были обнаружены на территории России впервые.

В главе 6 исследована органотропная и субстратная специализация фомоидных грибов, выделенных из подсолнечника и близкородственных сложноцветных. Показано, что изоляты *P. lindquistii* заражают как лист, так и стебель подсолнечника, вызывая некрозы, причем вектор распространения инфекции выявлен только в направлении от стебля на лист. В лабораторных условиях было впервые показано, что изоляты грибов *P. lindquistii* и *Diaporthe* spp. способны заражать не только подсолнечник, но и близкородственные ему дикорастущие растения (топинамбур, дурнишник и амброзию полыннолистную). Результаты экспериментов демонстрируют, что сорные близкородственные подсолнечнику растения являются потенциальными источниками сохранения и распространения заболеваний.

В разделе **Заключение** суммированы полученные результаты и изложены основные выводы из работы.

**По материалам диссертации опубликовано** 14 работ, из них 6 входят в Перечень российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук. **Автореферат** в полной мере отражает содержание диссертационной работы.

У оппонента имеются следующие **вопросы**:

1. Почему при тестировании гербарных образцов использовали только последовательности региона ITS?

2. При морфологическом изучении фомоидных грибов приводятся данные только по морфологии пикнид и конидий. Почему не приведена морфология плодовых тел и аскоспор?

По объему выполненных исследований, научному и методическому уровню, новизне и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Гомжиной Марии Михайловны "Фомоидные грибы на подсолнечнике и близкородственных сложноцветных растениях в России" соответствует требованиям п.п. 9-11, 13, 14 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного Постановлением правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 года, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.12 – Микология.

Еланский Сергей Николаевич

доктор биологических наук по специальности  
03.02.12 – Микология, ведущий научный  
сотрудник кафедры микологии и альгологии  
биологического факультета ФГБОУ ВО  
«Московский государственный университет  
имени М.В.Ломоносова» 119991, Российская  
Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1  
Телефон: (495) 939-10-00 E-mail: info@rector.msu.ru

Вручил рукопись для С.Еланского заверю  
декан биологического факультета МГУ  
академик У.К. Курдюмов

