

«УТВЕРЖДАЮ»

директор Федерального государственного
бюджетного научного учреждения «Всероссийский
научно-исследовательский институт фитопатологии»
доктор биологических наук, доцент



Алексей Павлович Глинушкин

«29» апреля 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации - Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт
фитопатологии» (ФГБНУ ВНИИФ) на диссертационную работу
Анастасии Андреевны Шныревой
«Грибы рода *Pleurotus*: генотипирование и анализ локусов половой
совместимости», представленную на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности: 03.02.12 – Микология.

Диссертация А. А. Шныревой посвящена исследованиям, связанным с анализом генома гриба вешенки - одного из наиболее популярных объектов биотехнологии грибов.

Актуальность выбранной диссертантом темы обусловлена тем, что плодовые тела некоторых видов рода *Pleurotus* не только являются ценным пищевым продуктом, но содержат ряд биологически активных веществ, таких, например, как природные статины, снижающие уровень «вредных» фракций холестерина в крови человека и животных, а также антиоксиданты и противоопухолевые соединения.

Несомненный интерес представляют обнаруженные в клетках вешенки ферменты, способные разрушать некоторые микотоксины, загрязняющие как пищевые продукты, так и корма, предназначенные для сельскохозяйственных животных и птиц. Применение методов идентификации, основанных на сравнении морфологических признаков, в данном случае, не очень надежно,

так как эти свойства у вешенки очень вариабельны и могут зависеть от условий выращивания. Поэтому наряду с необходимостью использования классических методов определения грибов, основанных на изучении их морфолого-культуральных признаков, для достоверной идентификации необходимо применение методов молекулярно-генетического анализа исследуемых видов.

Селекция новых высокопродуктивных линий съедобных культивируемых видов *Pleurotus* и их внедрение в практику позволит разнообразить ассортимент грибных продуктов промышленного производства, предлагаемых на отечественном рынке. Селекция линий вешенки, продуцентов биологически активных соединений, имеющих медицинское и сельскохозяйственное значение, позволит предложить новые продукты и разработки для биотехнологического производства. Разработанные автором методы молекулярного анализа имеют практическую значимость для контроля чистоты культур грибного происхождения, хранящихся в коллекциях промышленных микроорганизмов.

Следуя поставленной в диссертационной работе цели, которая состоит в генетическом анализе различных видов вешенки, а также выявлении генетических механизмов, регулирующих половое размножение вешенки, что должно способствовать созданию системного подхода к молекулярной идентификации многочисленных видов рода *Pleurotus*, автор провел молекулярно-генетический анализ локуса *matA*, контролирующего половую совместимость у вида *P. ostreatus*.

На основе рестрикционного анализа последовательности кластера рибосомальных генов диссертантом был разработан метод молекулярной идентификации видов вешенки, который позволил решить давно обсуждавшийся микологами вопрос о таксономической принадлежности штаммов, входящих в состав четырех комплексных видов. Эффективность молекулярной идентификации видов рода *Pleurotus* при помощи рестрикционного анализа амплифицированной последовательности ITS1-

5.8S-ITS2 с использованием четырех подобранных эндонуклеаз рестрикции была автором подтверждена экспериментально.

В результате модификации метода получения плодовых тел автором в лабораторных условиях впервые были получены полноценные плодовые тела одного из несъедобных видов вешенки.

Диссертант провел компьютерный анализ структуры генов локуса *matA*, которые кодируют гомеодоменные факторы совместимых в половом отношении гаплоидных штаммов *P. ostreatus*. Данные этого анализа позволили создать генно-инженерные конструкции, содержащие гены гомеодоменных белков. Эти рекомбинантные конструкции планируется в будущем перенести в таксономически далекие виды грибов для изучения функционального взаимодействия белков неродственных хозяев.

Структура диссертационной работы вполне традиционна. Впечатляет объем выполненных автором работ. В тексте встречаются неизбежные, в таких случаях, опечатки, но их количество незначительно.

Литературный обзор соответствует теме диссертации, он достаточно полно описывает современное состояние исследований, которым посвящена работа. Автор вполне обоснованно ограничился обзором литературы, описывающей области систематики и таксономии видов рода *Pleurotus*, а также молекулярных факторов, контролирующих процессы половой совместимости грибов.

Содержание раздела «Материалы и методы» свидетельствует о том, что автор владеет широким арсеналом современных методов исследований в области микологии, молекулярной биологии, биотехнологии и генной инженерии.

Название диссертационной работы вполне отражает ее суть и содержание.

Выводы и рекомендации вполне корректны и отражают представленным в работе результатам. В то же время имеются некоторые замечания.

1. Стр. 37. Раздел 2.5.1. Выделение геномной ДНК.

Автор употребляет неопределенные выражения: «молодой мицелий» и «небольшой кусочек плодового тела гриба». В описании методики желательно было бы указывать конкретные данные о возрасте гриба, количестве отбираемого для анализа образца, а также в каком объеме ТЕ буфера ресуспендировали мицелий при описании экспресс-методики выделения ДНК.

Автор не указывает как оценивали качество и количество выделенной ДНК. Это тем более было бы уместно, так как на следующей странице (38-ой) точно указывается, что для постановки ПЦР использовали 10 нг геномной ДНК.

2. Стр. 39. Раздел 2.5.4. Баркодинг на основе рестрикционного анализа ITS последовательностей.

В описании метода не уточнено, какой именно использовался агарозный гель для разделения фрагментов ДНК после рестрикции. Не понятно, почему автором был выбран агарозный гель, а не полиакриламидный гель (ПААГ), который позволяет лучше разделять фрагменты ДНК, особенно небольшого размера.

Не указано количество ПЦР-продукта, использованного для рестрикции, а также нет данных о том, какие количества образца после рестрикции использовались для электрофореза.

3. Стр. 40. Раздел 2.6. Биоинформатический анализ структуры...

Непонятен термин «биоинформатический», может быть «биоинформационный»?

Стр. 76. Рис 9.

Вызывает сомнение выбор маркера. Маркер GeneRuler 100bp DNA Ladder имеет шаг, равный 100 п.н., автор предлагает использовать его для оценки по размерам фрагментов ДНК после рестрикции, имеющих достаточно близкие значения, например, у представителей вида *Pleurotus cornucopiae* после рестрикции *Hinf*I образовывались фрагменты, равные 211, 143, 109, 98, 94, 8 п.н. Представители же вида *P. cornucopiae* - 211, 137, 101, 100, 79, 8 п.н. На представленном рисунке такие небольшие различия в положении фрагментов ДНК не видны.

Как указывалось выше, возможно, использование ПААГ, а не агарозного геля, позволило бы получить более четкие электрофореграммы.

Следовало бы представить электрофореграммы продуктов рестрикции отдельно по каждому ферменту и отдельно по смеси ферментов. Так было бы проще сравнивать образцы.

В работе некорректно используется термин «гомология», который более правильно было бы заменить на «сходство» или «идентичность». Гомологичными последовательностями называются лишь те, которые имеют общее происхождение, поэтому говорить о «степени» или «областях» гомологии неверно.

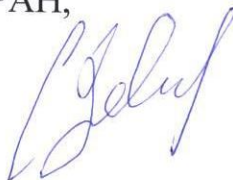
Сделанные замечания не снижают научной ценности диссертационной работы. Представленный автореферат вполне отражает основные положения диссертации.

На основании вышеизложенного считаем, что диссертация Анастасии Андреевны Шныревой «Грибы рода *Pleurotus*: генотипирование и анализ локусов половой совместимости», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.12 – микология, соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по данной специальности.

Отзыв составлен и одобрен на заседании ученого совета ФГБНУ ВНИИ фитопатологии в присутствии 16 человек, в том числе 4 доктора наук, протокол № 11 от 13 апреля 2015 года.

Отзыв составлен ведущим научным сотрудником отдела молекулярной биологии, членом-корреспондентом РАН, доктором биологических наук, профессором Сергеем Кириаковичем Завриевым.

Ведущий научный сотрудник
ВНИИФ, член-корреспондент РАН,
профессор



Сергей Кириакович Завриев

143050 Московская обл., Одинцовский район,
Большие Вяземы, Институт, Владение 5,
Тел. 8-495-799-10-27
skz@rambler.ru

Подпись Сергея Кириаковича Завриева заверяю:
Заведующая канцелярией
ФГБНУ ВНИИ фитопатологии



Галина Григорьевна Банюлис

29 апреля 2015 года

Ведущая организация

По диссертационной работе Анастасии Андреевны Шныревой

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

Адрес: 143050 Московская обл., Одинцовский район, Большие Вяземы,
Институт, Владение 5.

В структуре института существует отдел молекулярной биологии.

В отделе ведется научная работа во многих направлениях, в том числе в области молекулярной идентификации различных видов фитопатогенных грибов. Ранее проводились исследования в области клеточной биологии вешенки.

Сотрудники отдела являются авторами многих научных изданий, в том числе работ по молекулярной идентификации различных видов грибов:

Завриев С.К., Абрамова С.Л., Стацюк Н.В. и др. :

С. Л. Абрамова, Д. Ю. Рязанцев, Т. М. Воинова, С. К. Завриев. Диагностика фитопатогенных грибов *Septoria tritici* и *Stagonospora nodorum* методом FLASH-ПЦР // Биоорганическая химия. - 2008. - Т. 34. - No. 1. - С. 107-113.

С. Л. Абрамова, Д. Ю. Рязанцев, А. А. Стахеев, С. К. Завриев. Видовая идентификация изолятов из полевых образцов грибов рода *Fusarium* Вестник РАСХН. - 2011. - № 2. - С. 56-57.

С. Л. Абрамова, А. И. Жемчужина, Н. С. Жемчужина, Д. Ю. Рязанцев, С. К. Завриев. Идентификация возбудителей ржавчины пшеницы методом полимеразной цепной реакции // Вестник РАСХН. - 2011. - № 5. - С. 15-17.

Д. Ю. Рязанцев, С. Л. Абрамова, С. В. Евстратова, Т. Ю. Гагкаева, С. К. Завриев. Диагностика токсигенных грибов рода *Fusarium* методом FLASH-ПЦР // Биоорганическая химия. - 2008. - Т. 34. - No. 6. - С. 799-807.

Statsyuk N.V., Semina Yu.V., Perez F.G.M., Larsen M., Kuznetsova M.A., Kozlovskaya I.N., Morozova E.V., Deahl K.L., Grunwald N.J. CHARACTERIZATION OF RUSSIAN *PHYTOPHTHORA INFESTANS* POPULATIONS: DNA FINGERPRINTING AND SSR ANALYSIS // PPO-Special Report. 2014. № 16. С. 255-266.