

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Дубовского Ивана Михайловича «Эволюция резистентности вошинной огневки *Galleria mellonella* (L.) к энтомопатогенным бактериям и грибам» представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.05 – энтомология.

Представленная на отзыв диссертация И. М. Дубовского посвящена выявлению и анализу иммуно-физиологических адаптаций вошинной огневки, связанных с энтомопатогенными бактериями *Bacillus thuringiensis* и грибами *Beauveria bassiana*. Тема диссертации, актуальна уже своей практической составляющей – информация о защитных реакциях насекомых на энтомопатогены очень важна для выработки мер борьбы с опасными паразитами. Однако не менее ценны полученные результаты для развития фундаментальных представлений о механизмах устойчивости паразито-хозяйинных систем.

Работа Дубовского представляет собой комплексное исследование, в котором автор успешно применил подходы и методы, как классической энтомологии, зоологии, так и современной биологии для решения широкого круга вопросов, связанных с развитием энтомопатогенов, а также природой и динамикой резистентности вошинной огневки. В результате ему удалось значительно расширить не только представления о иммуно-физиологических адаптациях насекомых, но и на конкретном примере рассмотреть эволюцию устойчивости насекомых к энтомопатогенным бактериям и грибам.

Диссертация включает Введение, в котором детально обоснована актуальность исследования, показана степень разработанности темы, ясно сформулированы его цель и задачи, представлены положения, выносимые на защиту, а также кратко описаны методология и методы диссертационного исследования.

Глава «Обзор литературы» даёт полное представление об истории и изученности рассматриваемых в диссертации вопросов. Она прекрасно подготавливает читателя к знакомству с экспериментальной частью работы, а

также демонстрирует взгляды автора на организацию защитной системы насекомых на разных уровнях. Кроме того, глава подробно знакомит с энтомопатогенными факторами, используемыми для иммунизации.

Тем не менее, этот раздел вызвал большинство текстовых, в основном стилистических замечаний. Представляется спорным утверждение автора, что организация иммунной системы воцинной огневки хорошо изучена на основании того, что «...описаны важнейшие гены антимикробной, антиоксидантной и детоксицирующей систем, принимающих участие в защите против энтомопатогенных микроорганизмов...» (с. 10). Это серьёзные достижения, однако, к сожалению, иммунная система недостаточно изучена у всех беспозвоночных. На фоне прочих можно говорить лишь об относительной изученности данной модели.

В некоторых случаях небрежно указываются названия насекомых (например, с. 46): не только не приводятся отряды, но даже не расшифрованы родовые названия. Следовало бы также уточнить вид речного рака с. 45...

Встречаются и терминологические ошибки – скорее опечатки – всё-таки не «мальпигиевые» (с. 52), а мальпигиевы сосуды др.

Затем следует глава 1 «Материалы и методы», где на 20-и страницах описаны объекты экспериментальных исследований (насекомые и энтомопатогены), методы их культивирования, а также изучения защитных реакций насекомых. Представленные здесь сведения позволяют понять логику экспериментальных наблюдений, выполненных автором, а также оценить высокий методический уровень работы.

Единственный вопрос в этой главе вызывает фраза «Объектом исследований служили личинки большой воцинной огневки *Galleria mellonella* ... лабораторной популяции (ИсиЭЖ), отличающиеся темной окраской и собранные в 2006 г...» (с. 63). Всё-таки, культивировавшиеся или собранные? Если основой для лабораторной культуры послужили особи, собранные там-то и тогда-то, то это так и надо писать. То же относится и к описанию второй линии.

Весь последующий материал объединен в трёх главах, каждая из которых содержит данные по конкретному вопросу. Название и общее содержание этих разделов представляются удачными, выстроены они однотипно и посвящены изложению результатов. Каждая глава завершается заключением. К сожалению, автору не всегда удалось чётко отделить собственные данные от литературных. Возможно, были бы уместны заключения к подразделам, а материал из заключений к главам перенести в общее заключение. Тем не менее, результаты исследования изложены очень понятно, чему способствуют многочисленные иллюстрации (2 таблицы и 68 рисунков). Кроме того, имеется список сокращений и приложение, где собраны данные по статистике и молекулярно-биологическому анализу.

Рисунки хорошо продуманы, выбор их формы адекватен полученным результатам. Обще замечание к большинству иллюстраций – неясно, что отражают «усы» на графиках? Ошибка, процентный доверительный интервал (какой), стандартное отклонение? Почему «усы» односторонние — особенно с учетом того, что для долей они в принципе могут быть симметричными только при выборочной доле ровно в 0,5 (50%)? В то же время на многих графиках вообще нет «усов»...

Есть вопрос к содержанию подписи к рисунку 6: «Экспрессия антимикробных белков...». Но рисунок посвящён результатам изучения экспрессии генов, кодирующих эти белки. Этому посвящён и раздел, в котором находится рисунок. Экспрессия гена не всегда означает экспрессию самого белка, так как экспрессии гена исследуется на уровне транскриптов. Согласно тексту белки не выделяли и не анализировали по составу. Так что можно говорить только об экспрессии гена.

Аналогичное замечание по разделу 3.6.3.: «Уровень экспрессии белков теплового шока при бактериозе». Но речь идёт о генах, кодирующих БТШ.

Завершает основное содержание рукописи общее заключение – небольшое по объёму, но ёмкое по содержанию, где убедительно подытоживаются взгляды Дубовского на эволюционные преобразования

иммунной системы вошинной огнёвки (в том числе под воздействием к энтомопатогенным бактериям и грибам). Отдельно стоит отметить оригинальные схемы, наглядно иллюстрирующие механизмы защитных реакций насекомых на энтомопатогенные факторы.

Оценивая диссертацию в целом, следует отметить, что автором была проведена большая селекционная работа насекомых по признаку резистентности к *Beauveria bassiana* и к *Bacillus thuringiensis*. В результате были получены линии вошинной огневки, обладающие повышенной по сравнению исходными особями резистентностью к этим патогенам по нескольким признакам.

В частности у насекомых линии, устойчивой к *Bacillus thuringiensis*, в кишечнике и жировом теле происходит повышение уровня экспрессии генов, кодирующих антибактериальные белки, активизируется антиоксидантная система, повышается регенерационная активность тканей и способность инактивировать бактериальные токсины.

Также разносторонне и подробно описана картина защитных реакций насекомых при бактериальном заражении. Достоверно показано, что заражение насекомых бактериями *Bacillus thuringiensis* приводит к снижению общего числа гемоцитов в гемолимфе, но повышает активность фенолоксидазы в плазме, а также лизоцим-подобной активности в гемолимфе. В эпителии кишечника и жировом теле заражённых бактерией насекомых изменяется и уровень экспрессии генов таких антибактериальных белков как галлериомицин и галиомицин. В экспериментах с РНК-интерференцией генов индуцибельного ингибитора металлопротеаз и глутатион пероксидазы показана большая значимость этих веществ в антибактериальном ответе.

Очень интересным оказался результат анализа бактериального сообщества вошинной огневки при заражении *B. thuringiensis*. У заражённых особей происходит сдвиг в составе доминантов бактериального сообщества

от типа *Firmicutes* к типу *Proteobacteria*. При этом у личинок устойчивой линии снижается биоразнообразие всех бактерий в кишечнике.

Показано, что селекция вощиной огневки по признаку устойчивости к *Beauveria bassiana* приводит к повышению резистентности только к этому виду грибов, но не влияет на восприимчивость к грибам другого вида — *Metarhizium robertsii*.

Анализ всей совокупности реакций иммунного ответа и анатомических особенностей показал, что личинки меланистической морфы вошинной огневки в несколько раз устойчивее к грибу *Beauveria bassiana* по сравнению с особями светлой окраски. В кутикуле «меланистов» интенсивнее развивается процесс, в гемолимфе быстрее повышается количество гемоцитов, активнее происходит инкапсуляция синтез антимикробных белков, индуцибельного ингибитора металлопротеаз, повышается активность фенолоксидазы. Показано также усиление регенерационных способностей, антиоксидантной и детоксицирующих систем.

В результате автор делает важное заключение о том, что эволюция резистентности к патогенам идет не только в направлении повышения способностей к элиминации, но и по пути детоксикации его вторичных метаболитов и последствий иммунной реакции. Кроме того, у насекомых формируется уникальный набор адаптаций к определенным группам патогенов.

Работа ценна не только для понимания путей эволюции иммунитета у насекомых, но и для установления механизмов устойчивости паразито-хозяйинных систем. Исследование является хорошим примером удачного сочетания различных методических и идеологических подходов для разностороннего анализа сложно организованной иммунной системы. Используемые в ней алгоритмы могут применяться как стандартные тесты для анализа иммунного ответа других насекомых. В описании разных методологических подходов (биохимический анализ, молекулярно-биологический анализ) автор использует грамотную терминологию, избегая

лабораторного молекулярного жаргона, широко распространенного в современных энтомологических, зоологических и т. п. работах.

Выводы диссертации хорошо сформулированы и соответствуют поставленным целям и задачам. Материалы диссертации полно изложены в серии публикаций соответствующего требованиям ВАК уровня. Текст автореферата отражает основное содержание работы. Практическое применение получают многие методические разработки, предложенные автором. Результаты исследования могут быть использованы в университетских курсах энтомологии, экологии, паразитологии, сравнительной иммунологии, микробиологии.

Диссертационное исследование Дубовского Ивана Михайловича обладает научной новизной, практической ценностью и, безусловно, отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Правительством РФ 24 сентября 2013 г., предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения ему степени доктора биологических наук по специальности 03.02.05 – энтомология.

15 января 2016 г.

Заведующий кафедрой зоологии
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
профессионального образования
«Российский Государственный Педагогический
Университет им. А. И. Герцена»

д. б. н., проф.

Г. Л. Атаев

РГПУ им. А.И. Герцена

подпись *Г. Л. Атаев*

удостоверяю «15 ЯНВ 2016»

Отдел персонала

управления кадров и социальной работы



Велущий документ
отдела персонала

О.И.Гайдай

