

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Дубовского Ивана Михайловича «ЭВОЛЮЦИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВОЩИННОЙ ОГНЕВКИ *GALLERIA MELLONELLA* (L.) К ЭНТОМОПАТОГЕННЫМ БАКТЕРИЯМ И ГРИБАМ», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.05 – энтомология

Энтомопатогенные бактерии и грибы широко распространены в биоценозах, являясь природными регуляторами численности насекомых, что явилось основанием их использования для создания микробиологических средств защиты растений от фитофагов. Вместе с тем, в изучении взаимоотношений паразит-хозяин многие вопросы остаются неизученными, что мешает пониманию глубинных процессов этих взаимодействий. Так, важно выяснить влияние хозяина на специализацию и факторы вирулентности паразитов, выявить общие тенденции в ходе микроэволюции резистентности насекомых к бактериальным и грибным энтомопатогенам. Представленная диссертация посвящена выяснению иммунофизиологических адаптаций при формировании резистентности насекомого к энтомопатогенным бактериям *Bacillus thuringiensis* и грибам *Beauveria bassiana* на примере их взаимодействий с модельным объектом - вощинной огневкой *Galleria mellonella*.

Для комплексного подхода к этой проблеме, автором проведены всесторонние исследования основных защитных реакций насекомого, обобщены сведения об общих тенденциях в ходе микроэволюции резистентности насекомых к бактериальным и грибным энтомопатогенам. Отсюда несомненна **актуальность темы** диссертации.

Обзор литературы свидетельствует о глубоком анализе данных отечественных и зарубежных авторов, отражены современные взгляды на механизмы взаимодействия *Bacillus thuringiensis* (БТ) и грибов родов *Beauveria* и *Metarhizium* с хозяевами, особое внимание обращено на механизмы резистентности насекомых к бактериальным и грибным

инфекциям. Критическое рассмотрение работ позволило автору выделить пробелы в изучении эволюционных, экологических, физиолого-биохимических и молекулярных аспектов формирования резистентности насекомых к энтомопатогенам.

В главах 3-5 диссертации последовательно раскрываются концептуальные положения, выносимые автором на защиту. Прежде всего изучены взаимоотношения в системе насекомое - БТ, причем для сравнительных экспериментов использован направленный отбор воцинной огневки по устойчивости к БТ. Это позволило провести сравнительные исследования иммунного ответа при бактериозе, а также защитных механизмов, принимающих участие в формировании резистентности к БТ. Известно, что ключевым моментом действия Cry-токсинов БТ после растворения кристаллов в кишечнике является его активация протеазами. Поэтому интересны результаты диссертанта, демонстрирующие, что у устойчивых насекомых в 13 раз повышен уровень экспрессии индуцибельного ингибитора металлопротеаз (ИМРІ) по сравнению с восприимчивыми, а при заражении БТ экспрессия ИМРІ увеличивается. Эти результаты убедительно показывают, что данный ингибитор может блокировать протеолиз протоксинов БТ и таким образом увеличивать резистентность к нему насекомого. Для подтверждения вклада ИМРІ в устойчивость насекомого к бактериальной инфекции, проведен эксперимент с подавлением экспрессии (сайленсингом) ИМРІ, подтвердивший защитную роль этого ингибитора протеаз при бактериозе. Кроме того, основываясь на том, что ИМРІ может связываться с аминопептидазами, автор экспериментально доказал, что снижение активности этих ферментов на поверхности эпителиальных клеток устойчивых насекомых может приводить к снижению уровня связывания эндотоксина БТ в кишечнике, повышая устойчивость насекомых к БТ. Наконец, данные авторов согласуются с гипотезой, что активная пролиферация и регенерация эпителия среднего кишечника может быть одной из ключевых адаптаций насекомых к БТ.

Иммунный ответ насекомого на вторжение БТ детально изучен по ряду параметров клеточного и гуморального иммунитета при заражении сублетальной и полублетальной концентрациями бактерий в гемолимфе, жировом теле и кишечнике. Экспериментально доказано, что увеличение активности реакций клеточного иммунного ответа - фагоцитоза и инкапсуляции происходит при заражении насекомых сублетальной концентрацией БТ. Дополнительно дана оценка таких показателей как фенолоксидазная и лизоцим-подобная активность в плазме гемолимфы и других.

Учитывая, что важнейшим компонентом иммунных реакций насекомых являются антимикробные белки (АМБ), диссертант в серии экспериментов изучил уровень экспрессии генов антимикробных белков с помощью метода ПЦР в реальном времени. Как справедливо отметил автор на основании полученных результатов, синтез АМБ в кишечнике, как первичном месте проникновения и развития патогена, может играть важную роль на первых этапах воздействия бактерий и их метаболитов на организм насекомых. Заражение насекомых бактериями вызывало достоверно более высокий уровень экспрессии таких генов антимикробных пептидов, как галлеримицин и галлиомицин, в кишечнике инфицированных насекомых по сравнению с уровнем синтеза в жировом теле. Для дополнительной оценки вклада АМБ в подавление бактериальной инфекции, проведен эксперимент с подавлением экспрессии гловерина. При этом установлено, что подавление экспрессии гловерина приводит к достоверному увеличению смертности насекомых при заражении БТ.

В аспекте эволюции резистентности *G. mellonella* к БТ логичен переход к исследованиям показателей иммунитета у линий насекомых с различной чувствительностью к энтомопатогенным бактериям. Для этого сравнивались такие показатели как активность фенолоксидаз и инкапсуляция в гемолимфе, лизоцим-подобная активность в кишечнике, а также уровень экспрессии генов иммунного ответа у насекомых, селектированных на устойчивость к

БТ. Анализируя полученные результаты, автор пришел к выводу о вторичной роли реакций инкапсуляции и ФО в формировании резистентности вошинной огневки к БТ в ходе микроэволюции. В связи с этим далее основное внимание уделено изучению локальных иммунных реакций в кишечнике насекомых как месте проникновения инфекции. Дополнительно проведены исследования системного иммунного ответа АМБ в жировом теле. Следует отметить умение автора обобщить большой объем собственных данных в сопоставлении с результатами, опубликованными в зарубежных источниках последних лет, что позволило ему подтвердить гипотезу о том, что насекомые устойчивой линии могут противостоять бактериальной инфекции БТ за счет повышенного базового уровня и дополнительной экспрессии АМБ генов в кишечнике при бактериозе. По мнению автора, основанному на экспериментальных данных, кишечный бактериоз приводит к стимуляции клеточной и гуморальной иммунной системы вошинной огневки с повышением активности всех звеньев иммунного ответа.

Логичным представляется решение автора сконцентрировать усилия на изучении антиоксидантной системы кишечника и провести сравнительный анализ на двух линиях *G. mellonella* (контрольной и селектированной на устойчивость к БТ). Увеличение концентрации малонового диальдегида (МДА) как основного показателя перекисного окисления липидов (ПОЛ) было максимальным в первый день заражения БТ с последующим снижением, чему дано адекватное объяснение. Поскольку усиление ПОЛ ведет к увеличению активированных кислородных метаболитов (АКМ), дальнейшее изучение вклада антиоксидантной системы касалось оценки таких параметров как баланс тиолов, активность супероксиддисмутазы, глутатион-S-трансферазы и каталазы. Полученные результаты позволили диссертанту связать данные смертности насекомых с уровнем ПОЛ в кишечнике и активностью антиоксидантов.

Следуя логике построения собственных исследований, далее автор сравнил данные по уровню генерации АКМ, концентрации МДА и соотношению тиолов в кишечнике, а также по уровню экспрессии регуляторов окислительно-восстановительного баланса в жировом теле и кишечнике насекомых с различной чувствительностью к *B. thuringiensis*. По справедливому заключению диссертанта, полученные данные подтверждают гипотезу о важной роли антиоксидантной системы насекомых в противобактериальной защите.

В завершение исследований ответной реакции двух линий вошинной огневки на заражение БТ автором рассмотрено участие белков теплового шока в бактериальном патогенезе, а также состав микрофлоры кишечника насекомых. Анализируя и обобщая данные главы 3, И.М. Дубовский правомерно заключает, что ключевые адаптации насекомых к БТ связаны с начальными этапами инфекции и сосредоточены в кишечнике насекомых, а эволюция защитных реакций, связанных с кишечником, направлена на повышение их базовой активности.

В связи с тем, что и *B. thuringiensis*, и *B. bassiana* относятся к наиболее распространенным регуляторам численности насекомых и используются как основа биопрепаратов, важно сравнение развития устойчивости насекомых к этим энтомопатогенам. Разница в механизмах действия бактерий и грибов на насекомых, определила подходы к изучению стратегии устойчивости к грибам на примере *B. bassiana*. Основываясь на известной роли меланина в ограничении развития грибов, автор использовал внутривидовые морфы вошинной огневки с разной степенью меланизации кутикулы (ахромисты и меланисты). Эти формы сравнивались по восприимчивости к грибу, по клеточному и гуморальному иммунному ответу и другим показателям. Полученные результаты были обобщены диссертантом, который пришел к выводу что защитные механизмы меланистической морфы вошинной огневки направлены на активные стадии микоза, связанные с прорастанием через кутикулу и развитием гриба в

гемоцеле, а резистентность меланистов к грибу является следствием кутикулярных и клеточных защитных реакций.

Несомненно важным представляется проведение направленного отбора насекомых по принципу устойчивости к *B. bassiana* для изучения вклада иммунной системы *G. mellonella* к грибам как в случае с БТ. При этом автором отмечен интересный факт, что отбор на устойчивость к *B. bassiana* приводил к специфической устойчивости, полученная линия была при этом восприимчива к другим видам грибов. Поэтому анализ реакций клеточного и гуморального иммунитета у насекомых селектированной и контрольной линий проведен при заражении двумя грибами *B. bassiana* и *M. robertsii*. В экспериментах по выявлению иммунного ответа оценивались те же показатели, что и с заражением БТ, но дополненные сравнением *B. bassiana* и *M. robertsii*. Диссертант выявил ряд иммуно-физиологических адаптаций, обеспечивающих повышение специфической устойчивости к *B. bassiana*, показал вклад фенолоксидаз, экспрессии галлериомицина и галимицина в покровах и т.д. Автор пришел к выводу, что отличия в иммунном ответе устойчивой и восприимчивой линий насекомого на грибную инфекцию *B. bassiana* и *M. robertsii*, связаны с различным набором факторов вирулентности этих патогенов. Можно согласиться с утверждением автора, что впервые продемонстрирована способность насекомых формировать устойчивость к энтомопатогенному грибу за счет многокомпонентного усиления барьерных функций покровов.

К достоинствам диссертанта относится умение тщательно анализировать и обобщать полученные результаты, сопоставляя их с данными, доступными в литературе. Это выразилось в написании заключений к каждой главе и обширного общего заключения. Впечатляет выполнение большого числа трудоемких экспериментов с привлечением современных биохимических и молекулярно-биологических методов. Диссертация хорошо иллюстрирована.

Исходя из изложенного, **научная новизна и практическая ценность** представленной диссертации не вызывает сомнения. Например, впервые

зарегистрировано, что развитие бактериоза, вызванного *B. thuringiensis*, приводит к нарушению окислительно-восстановительного баланса в организме насекомых, выявлено участие антимикробных белков в защите насекомых от бактериальной инфекции *B. thuringiensis*. Охарактеризованы иммуно-физиологические защитные реакции в кишечнике при эволюции резистентности насекомых к БТ. Впервые проведена селекция насекомых из отряда Lepidoptera на устойчивость к грибу *B. bassiana*. Показано, что эволюция резистентности к энтомопатогенным грибам приводит к усилению как неспецифических, так и специфических защитных реакций, усиливающих барьерные функции покровов. Результаты по формированию резистентности насекомых к бактериям и грибам полезны для усовершенствования методов контроля численности вредителей сельского и лесного хозяйства.

Достоверность полученных результатов подтверждается адекватной математической обработкой данных. Содержание диссертации отражено в большом количестве публикаций, в том числе в 24 статьях, опубликованных в журналах библиографической базы Web of Science, входящих и в Перечень ВАК. Материал апробирован на конференциях разного ранга. Автореферат в целом соответствует содержанию диссертации. Автор полностью раскрыл концептуальные положения, выносимые на защиту.

Некоторые замечания по диссертации. 1) Целесообразно было добавить еще один вывод, касающийся сходства и различия в эволюции резистентности насекомых к *B. thuringiensis* и *B. bassiana* (что обсуждено в общем заключении); 2) На с. 65 в объектах «грибы» описан только *M. robertsii*, но нет основного объекта *B. bassiana*; 3) В тексте часто употребляются термины «сублетальная концентрация» и «сублетальная доза» как взаимозаменяемые термины, хотя следует употреблять только первое выражение; 4) В автореферате на с.11 приведены данные литературы по биоконтролю *G. mellonella*, не относящиеся к материалам и методам; 5) в работе замечены опечатки, например, в словах «галлеримицин» и

«галлеомицин», и некоторые неудачные выражения, например, «сублетальный бактериоз» вместо «бактериоз при сублетальной инфекции».

Несомненно, перечисленные замечания ни в коей мере не снижают достоинств выполненного исследования, представляющего крупный вклад в изучение эволюции резистентности насекомых к энтомопатогенным микроорганизмам.

На основании изложенного считаю, что диссертация «Эволюция резистентности вошинной огневки *GALLERIA MELLONELLA* (L.) к энтомопатогенным бактериям и грибам» соответствует критериям, установленным в п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней». Автор И.М. Дубовский заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.05 – энтомология.

11.01.2016

Профессор кафедры защиты растений,
заслуженный деятель науки РФ,
доктор биологических наук, профессор
Штерншис Маргарита Владимировна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный аграрный университет». 630039, г. Новосибирск, ул. Добролюбова, 160, НГАУ. Тел. (383)2672847; e-mail: shternshis@mail.ru

Подпись

УДОСТОВЕРЯЮ

Начальник ОК

Т.О. Воличко