

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Крюкова Вадима Юрьевича
«АДАПТАЦИИ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ АСКОМИЦЕТОВ
(ASCOMYCOTA, HYPOCREALES) К НАСЕКОМЫМ-ХОЗЯЕВАМ И
ФАКТОРАМ СРЕДЫ В УСЛОВИЯХ КОНТИНЕНТАЛЬНОГО
КЛИМАТА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ И КАЗАХСТАНА», представленную
на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности
03.02.08 – Экология (биология)

Важную роль в регуляции численности насекомых-фитофагов играют энтомопатогенные аскомицеты, однако степень их влияния на насекомых-хозяев определяется рядом экологических факторов. При этом малоизученными остаются взаимоотношения токсигенных и биотрофных штаммов с насекомыми-хозяевами разных таксонов, влияние абиотических и биотических факторов на систему энтомопатогенный гриб - насекомое и другие вопросы. Представленная диссертация посвящена анализу адаптаций наиболее значимых энтомопатогенных грибов, развитию микозов и защитных реакций хозяев с оценкой влияния экологических факторов в условиях Западной Сибири и Казахстана. Для осуществления комплексного подхода к этой проблеме, автором проведены масштабные исследования на уровне сообществ аскомицетов и растительноядных насекомых, их взаимосвязей на фоне влияния экологических факторов. Многие из этих вопросов до последнего времени оставались дискуссионными или нерешенными, особенно в условиях континентального климата обозначенных территорий. Поэтому **актуальность темы** диссертации не вызывает сомнений.

Изложение материала по главам призвано раскрыть концептуальные положения, выносимые автором на защиту. Первоначально рассмотрена принадлежность изучаемых грибов к анаморфным и телеоморфным формам в аспекте их распространения, круга насекомых-хозяев и эпизоотического потенциала.

Среди выделенных В.Ю. Крюковым образцов энтомопатогенных грибов доминировал морфовид *Beauveria bassiana* s.l., в качестве хозяев которого зарегистрированы насекомые из 7 отрядов и 32 семейств. Из малочисленных анаморф отмечены *Beauveria brongniartii*, *Isaria fumosorosea* и грибы рода *Metarhizium*. Показана принадлежность сибирских популяций *Metarhizium* к *M. robertsii* и *M. flavoviride* var. *pemphigi*, для чего привлечены методы молекулярно-генетического анализа. Телеоморфные формы

энтомопатогенных грибов зарегистрированы автором только в мелколиственных и сосново-мелколиственных лесах северо-восточной части Новосибирской области. При этом значительным результатом стало описание эпизоотий в популяциях нескольких видов насекомых, вызванных грибами рода *Cordyceps*, что указывает на их роль в регуляции численности насекомых-филлофагов в северной лесостепи Сибири.

Важную проблему взаимосвязи трофической специализации и патогенных стратегий грибов (биотрофной и токсигенной) автор раскрывает на примере грибов рода *Metarhizium*. Для этого исследованы два штамма: *M. robertsii* Р-72 с токсигенной стратегией и Мак-1 с биотрофной стратегией. Штамм Мак-1 поражал разные виды насекомых четырех отрядов, при этом для него были характерны относительно длительные микозы и обильное спороношение на погибших хозяевах. Для Р-72 показана более ранняя гибель насекомых, при том, что гриб погибал вместе с хозяевами как на стадии колонизации насекомых, так и в некротрофной фазе цикла. Продуктивность конидиеобразования была ниже, чем у Мак-1. Экспериментально подтвержден более выраженный ответ защитных систем насекомого на инфекцию, вызванную токсигенным штаммом Р-72 на начальных этапах микоза (повышение уровня фенолоксидаз в кутикуле при заражении, снижение общего числа гемоцитов и подавление процесса инкапсуляции, увеличение активности неспецифических ферментов в лимфе и жировом теле насекомых). В то же время при заражении насекомых биотрофным штаммом Мак-1, на начальных этапах микоза не наблюдалось достоверных изменений в реакциях иммунной и детоксицирующей систем. В связи с изложенным отметим, что для доказательства своих гипотез автор осуществляет их проверку на серии четко продуманных экспериментов. Интересен опыт по смешанному заражению, где показано конкурентное вытеснение биотрофного штамма токсигенным. Обсуждение собственных результатов с учетом данных из других источников, позволило автору сделать значимое в экологическом плане заключение, что токсигенная форма гриба в большей степени ассоциирована с растением, а взаимоотношения грибов с насекомыми-хозяевами окончательно не стабилизировались.

Особенности трофической специализации телеоморфных грибов исследованы на примере *C. militaris* при использовании различных способов заражения насекомых с оценкой иммуносупрессивного действия культур и отдельных метаболитов на насекомых и их восприимчивости к вторичным инфекциям. По мнению автора, в отличие от анаморфных грибов, метаболиты *Cordyceps*, нарушая линьку и метаморфоз, способны усиливать восприимчивость насекомых к другим энтомопатогенам. Можно согласиться

с автором, что эти результаты открывают перспективу разработки комбинированных препаратов для биологического контроля фитофагов.

При изучении влияния температуры на системы насекомое — энтомопатогенный гриб объектами исследования выбраны *Beauveria bassiana*, *Metarhizium* и *Cordyceps militaris*, выделенные в разных природных зонах Западной Сибири и Казахстана. Изучение влияния температурного фактора на рост мицелия и вирулентность по отношению к двум тест-насекомым позволило автору сделать вывод, что в условиях континентального климата для успешной регуляции численности насекомых более эффективны изоляты грибов, выделенные в степных ландшафтах. Что касается грибов рода *Metarhizium*, наиболее значителен результат, подтверждающий более высокий уровень термотолерантности по сравнению с другими представителями аскомицетов (*B. bassiana* и *C. militaris*). Заслуживают внимания эксперименты, проведенные на модельном объекте *G. mellonella* по действию оптимальной и субоптимальной температур на защитные реакции насекомого. Полученные В. Ю. Крюковым результаты позволили ему сделать важный вывод о том, что при пониженных для *G. mellonella* температурах происходит активация сублетальной грибной инфекции и усиление гибели микозов. Автор обоснованно объясняет это снижением показателей клеточного и гуморального иммунитета, что повышает восприимчивость насекомых к заболеванию. Не менее значимо вытекающее из результатов экспериментов заключение, что субоптимальные температуры могут служить одной из причин грибных эпизоотий в природных популяциях насекомых.

Совершенно оправданным является обращение автора к изучению роли сопутствующей инфекции и энтомофагов на развитие микозов. В реальной экологической ситуации заражение насекомых грибами сопровождается влиянием ряда биотических факторов, что может приводить к разному уровню суммарного эффекта. В этом отношении изучено влияние бактерии *Pseudomonas sp.* на систему анаморфные грибы - перелетная саранча *Locusta migratoria*. Результаты показали наличие аддитивного или синергического эффекта в гибели насекомых при совместном использовании бактерии с грибами *M. robertsii* или *B. bassiana*. На примере другого экологически и экономически значимого на исследуемых территориях фитофага (колорадского жука) выявлен синергизм в действии *M. robertsii* и *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* и изучены его возможные причины. Для этого оценивалась интенсивность реакции инкапсуляции и активность детоксицирующих ферментов при совместном и раздельном инфицировании личинок. Значительное уменьшение устойчивости насекомых к грибам

происходило за счет снижения интенсивности процесса инкапсуляции и ингибирования активации ферментов детоксицирующей системы под действием бактерий, что перспективно для микробиологической регуляции численности колорадского жука. Важно, что экспериментальный препарат на основе грибов и бактерий, испытанный в полевых условиях в степной зоне Новосибирской области и в окрестностях г. Алматы, показал высокую биологическую эффективность (75–95%) при одновременном снижении дефолиации картофеля.

Несомненный интерес представляет исследование диссертанта по влиянию эктопаразитоида *Habrobracon hebetor* на развитие микозов у гусениц *G. mellonella*. Контаминация яйцеклада габробракона достаточно низкими дозами гриба при дальнейшей парализации гусениц приводила к развитию у них микоза. Кроме того, автором установлен факт горизонтального распространения микоза за счет контактной передачи конидий энтомофагом.

Результаты работ по выявлению синергистов грибов из числа инсектицидных добавок вносят вклад в повышение эффективности биологического контроля насекомых. Так, диссертантом показано, что при совместном действии *M. robertsii* и фосфорорганического инсектицида Актеллик повышается гибель насекомых, что отражалось в биохимических изменениях жирового тела личинок колорадского жука. Из полусинтетических синергистов проведен скрининг 35 модификантов (R)- и (S)-усниновой кислоты. При сублетальной и полулетальной обработке личинок колорадского жука модификантом МУК-35 у насекомых наблюдались нарушения физиологических процессов и повышение восприимчивости к *B. bassiana*. Испытание смеси этого гриба с МУК-35 (0,03%) в полевых условиях Юго-Восточного Казахстана продемонстрировало высокую эффективность в отношении фитофага с резким возрастанием уровня дефолиации растений.

К достоинствам диссертанта относится выполнение большого числа трудоемких экспериментов с привлечением современных биохимических и молекулярно-биологических методов. В.Ю. Крюков грамотно интерпретирует собственные данные, привлекая для обсуждения результаты, известные из литературных источников.

Исходя из изложенного, **научная новизна и практическая ценность** представленной диссертации не вызывает сомнения. В частности, выявлены новые для территории Сибири и России виды энтомопатогенных аскомицетов. Установлено, что внутри вида *Metarhizium robertsii* существуют формы с разными патогенными стратегиями: биотрофной и токсигенной,

вызывающие различный ответ реакций клеточного, гуморального иммунитета и детоксицирующей системы насекомых. Показано, что дифференциация популяций *B. bassiana* в Западной Сибири и Казахстане зависит, преимущественно, от природно-зональных факторов, а степные штаммы *B. bassiana* являются наиболее вирулентными в условиях высоких температур и пониженной влажности. Впервые показана возможность горизонтального переноса энтомопатогенных грибов эктопаразитоидами.

Разработаны экологически безопасные подходы для регуляции численности насекомых–фитофагов на основе сочетания штаммов микроорганизмов и фторированных модификантов усниновой кислоты. Получены термотолерантные высоковирулентные штаммы грибов, перспективные для биологического контроля насекомых в условиях континентального климата.

Достоверность полученных результатов подтверждается адекватной математической обработкой данных. Содержание диссертации отражено в большом количестве публикаций, в том числе в 27 статьях, рекомендованных Перечнем ВАК. Материал апробирован на конференциях разного ранга. Автореферат соответствует содержанию диссертации. Диссертация хорошо оформлена, удачно иллюстрирована фотографиями и схемами. Автор полностью раскрыл концептуальные положения, выносимые на защиту.

К замечаниям относится следующее:

- 1) в таблице 8 (с.76) нет объяснений по выбору разного титра конидий грибов для разных тест-насекомых;
- 2) в сравнительном аспекте можно было дополнительно изучить влияние метаболитов *Cordyceps* на восприимчивость насекомых к *Metarhizium*;
- 3) спорным представляется перспективность добавления фосфорорганического инсектицида к энтомопатогенным грибам. Применение синтетических инсектицидов даже в сублетальных дозах может дискредитировать статус экологически безопасного контроля численности фитофагов. Известно, что сублетальные дозы таких инсектицидов вызывают быстрое привыкание насекомых и необходимость увеличения этих доз, что приводит к накоплению химикатов в окружающей среде;
- 4) целесообразно было бы часть текста в начале каждой главы, посвященный обсуждению данных российских и зарубежных ученых, обозначить как «состояние вопроса»;
- 5) в работе замечены опечатки и неудачные выражения, например, «ингибиторование» (с.85).

б) в качестве пожелания – дополнительное изучение судьбы выживших после заражения грибами личинок колорадского жука в лабораторных условиях может определить вклад обработки грибными препаратами в гибель следующего поколения насекомого;

Несомненно, перечисленные замечания ни в коей мере не снижают достоинств выполненного исследования, представляющего крупный вклад в изучение экологических связей насекомых, микроорганизмов и растений.

На основании изложенного считаю, что работа соответствует критериям, установленным в п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней». Диссертация «Адаптации энтомопатогенных аскомицетов (Ascomycota, Нурочеалес) к насекомым-хозяевам и факторам среды в условиях континентального климата Западной Сибири и Казахстана» представляет собой научно-квалификационную работу, в которой решена научная проблема, имеющая важное хозяйственное значение. Автор В.Ю. Крюков заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология (биология).

Профессор кафедры защиты растений,
заслуженный деятель науки РФ,
доктор биологических наук
по специальности 06.01.07 – Защита растений,
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

25 марта 2015 г.

