ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Яковлєва Єгора Борисовича "Ентомопатогенні нематоди (Nematoda: Rhabditida) в природних екосистемах України", подану до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.25 – паразитологія, гельмінтологія.

Актуальність теми дисертації. Характерною особливістю сучасного підходу до захисту рослин є цілеспрямоване скорочення застосування традиційних пестицидів шляхом використання всього різноманіття засобів і методів екологізації захисту рослин, в тому числі за рахунок більш широкого впровадження природних ворогів шкідливих організмів рослин, а саме паразитів, хижаків, збудників захворювань. У зв'язку з цим в останні десятиліття спостерігається експоненціальний ріст таксономічних та екологічних досліджень ентомопатогенних нематод, які можуть бути застосовані в якості біологічних агентів контролю шкідливих видів комах.

На теперішній час основна увага дослідників спрямована на вивчення ентомопатогенних нематод, поширених в агроценозах різних регіонів, тоді як дослідження їх різноманіття у природних екосистемах, зокрема охоронних та заповідних територіях, досі лишаються малочисельними. Цим було обумовлено актуальність представлених наукових пошуків, що були складовою трьох науково-дослідних тем відділу паразитології Інституту зоології ім. І. І. Шмальгаузена НАН України.

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів. Дисертація є повністю завершеним комплексним одноосібним дослідженням в частині збору матеріалу, культивування ентомопатогенних нематод, дослідження їхньої морфології та морфометрії, аналізу та узагальнення даних. Здійснення молекулярно-генетичних досліджень проведено автором у співпраці з науковцями Чеської Республіки, про що зазначено у роботі.

У ході досліджень автором визначено видовий склад та географічну структуру природних мікропопуляцій ентомопатогенних нематод в екосистемах України зі зниженим антропогенним впливом. В складі нативної фауни ентомопатогенних нематод за комплексного використання морфологічних, морфометричних та молекулярно-генетичних методів виявлено нематод з родини Steinernematidae – *Steinernema arenarium* Artyukhovsky, 1967 (2 ізоляти), *S. feltiae* Filipjev, 1934 (10 ізолятів), *Steinernema* sp. (ізолят U2). Доведено, що ентомопатогенні нематоди проявляють значну мінливість майже за усіма номінальними морфометричними параметрами.

На основі аналізу нуклеотидних послідовностей обраних генетичних маркерів визначено філогенетичні зв'язки ізолятів *S. feltiae* та *S. arenarium*; для останнього виявлено залежність у поширенні з географічними характеристиками району досліджень.

Встановлено вплив абіотичних факторів на розвиток нематод та продуктивність розмноження виду *S. arenarium* ізоляту СН в умовах наближених до природних. Виявлено, що зміна температурного режиму культивування значущо впливає на морфометричні ознаки дорослих ентомопатогенних нематод, чисельність інвазійних личинок при евазії з трупа комахи та призводить до формування «пігмейних» дорослих особин, що опосередковано вказує на зміни у характері живлення нематод в умовах вичерпної кількості поживних речовин. Вперше було зареєстровано «пігмейних» особин для виду *S. arenarium* ex situ та для ізолятів виду *S. feltiae* – in situ.

Відповідність змісту автореферату та основних положень дисертації. Зміст та структура автореферату Є.Б. Яковлєва цілком відповідає структурі, основним положенням та висновкам наведеним у його дисертації.

Публікація основних результатів дисертації. В результаті проведеної дисертаційної роботи автором опубліковано 12 наукових праць. Серед них 5 статей розміщено у фахових виданнях (які також індексуються міжнародними наукометричними базами), одна тезова робота та 6 публікацій у матеріалах конференцій, на яких відбувалась апробація результатів дослідження, викладених у дисертації.

Особистий внесок автора дисертаційної роботи не викликає сумніву. В роботі використано значну кількість необхідних варіантів досліджень, статистичних обробок експериментального матеріалу, що дозволило окреслити достовірні результати.

Дисертація складається із переліку умовних скорочень та вживаних термінів, вступу, чотирьох розділів, висновків, списку літератури та додатків, загальним обсягом 131 сторінка. Робота ілюстрована 32 рисунками та 20 таблицями. Перелік використаної літератури складає 139 джерела (із них 20 – кирилицею).

Оцінка змісту роботи.

Вступ (стор. 9-13). У цьому розділі автор у традиційному порядку окреслює актуальність, мету й завдання досліджень, наукові та практичні результати, що повноцінно відображають основні положення дисертаційної роботи.

Розділ 1. Огляд літератури (стор. 14-35)**.** У розділі автором лаконічно викладено історію дослідження ентомопатогенних нематод родин Steinernematidae та Heterorhabditidae, а також літературні дані щодо біології, філогенії, особливостей їхньої морфології і життєвих циклів, та перспективи подальшого вивчення.

Зауваження. Схематичне відображення плану будови кластеру генів 18S-28S (рис. 1.2, оригінал автора) є не зовсім вдалим в контексті масштабування, оскільки відомо, що за довжиною (кількістю пар нуклеотидів) найбільш короткою зазвичай є ділянка гену 5S, далі: ITS1 > ITS2 > 18S > 28S. Зокрема, в статті Спірідонова із співавторами (Spiridonov *та ін.*, 2004), на яку посилається автор, довжина нуклеотидної послідовності гену 5S для

досліджуваних ізолятів *Steinernema sp.* складає 154-156 пар нуклеотидів (пн), ITS1: 243-306 пн, ITS2: 243-375 пн.

Крім того, рисунок містить скорочення, яке відсутнє в переліку умовних скорочень (а саме – ВТВ).

Розділ 2. Матеріали досліджень та **Розділ 3. Методика досліджень.** Автором деталізовано представлено характеристику районів досліджень, надано опис методики відбору проб, виявлення інвазійних личинок ентомопатогенних нематод в лабораторних умовах, культивування тест-комах та ентомопатогенних нематод, виготовлення мікропрепаратів, здійснення морфологічних, морфометричних та молекулярно-генетичних досліджень, а також методів аналізу одержаних даних.

Зауваження. В тексті підрозділу щодо підготовки до полімеразно-ланцюгової реакції на стор. 43 зазначено, що для виділення ДНК в пробірки вносили 10-15 інвазійних личинок або 1-2 самиці, тоді як на стор. 44 по відношенню до них не зовсім коректно вживається термін «клітинний матеріал».

Назва підрозділу 3.9.2 «Полімеразно-ланцюгова реакція. Ділянка геному НТД 1–5.8S–НТД 2 (ITS1-5.8S-ITS2)» містить помилку – невідповідність українського та англомовного варіанту назви ділянки геному. Вочевидь це обумовлене помилкою при визначенні автором скорочення для ITS (internal transcribed spacer): *НТД (ITS) – не транскрибуюча ділянка* (стор. 8). Правильний варіант повинен бути: *ВТД (ITS) – внутрішня транскрибуюча ділянка*. Використання правильного скорочення дозволило б автору уникнути помилок із вживанням цього терміну на українській мові і в подальших розділах дисертації (зокрема, на стор. 44 – ВТВ).

В зазначеному підрозділі подано сіквенси праймерів, які було використано для здійснення полімеразно-ланцюгової реакції, проте не наведено посилання на авторів.

У підпису до рисунку 3.2 автором вживається термін «суміш послідовностей для масштабування». Більш точною є назва «маркер розміру молекулярних мас» із зазначенням розміру кожної поділки (що відповідає кількісті пар нуклеотидів).

Розділ 4. Результати дослідження та обговорення. В даному розділі автором лаконічно та повною мірою представлено результати проведених досліджень та їх критичний аналіз.

Зокрема, показано, що серед 434 ґрунтових проб, відібраних в екосистемах природно-заповідного фонду України та Зони відчуження Чорнобильської АЕС лише 3% містили ізоляти ентомопатогенних нематод, які за результатами морфологічних та морфометричних досліджень були віднесені до роду *Steinernema*. Молекулярно-генетичними методами два ізоляти були ідентифіковані як *Steinernema arenarium* та 10 ізолятів – як *Steinernema feltiae*. Лише морфологічними методами було визначено *Steinernema* sp. U2 (1 ізолят). Вид *Steinernema arenarium* зареєстрований автором вперше в Україні.

Показано, що ентомопатогенні нематоди обох видів виявляють значну індивідуальну морфологічну мінливість серед особин основних стадій життєвого циклу (перше та друге покоління дорослих, інвазійні личинки) за майже усіма номінальними параметрами та відповідними їм індексами, що унеможливлює ідентифікацію нематод лише за особливостями морфології та морфометричними параметрами.

Доведено, що значна морфологічна мінливість самців та самиць обох поколінь ентомопатогенних нематод залежить від якості та кількості поживного субстрату в трупі комахи, швидкості росту та набору індивідуальної маси дорослих особин нематод. Залежно від температури змінюється тривалість життєвого циклу, статеве та кількісне співвідношення поколінь нематод, кількість інвазійних личинок, що вийшли.

В двох нативних культурах ізолятів ентомопатогенних нематод *Steinernema feltiae* та експериментальній культурі *Steinernema arenarium* ізоляту СН було виявлено «пігмейних» дорослих особин. Для виду *Steinernema arenarium* «пігмейні» особини зареєстровані вперше. Встановлено, що ці нематоди зберігають здатність до розмноження. При культивації за високої температури виявлено ряд морфологічних аномалій, поява яких свідчить про нерівномірність росту внутрішніх структур нематод в умовах нестачі живлення.

Згідно з твердженням автора, *Steinernema feltiae* є найпоширенішим видом ентомопатогенних нематод на території України (42 % від сумарної кількості позитивних проб з агроценозів та природно-заповідного фонду).

В підсумку показано, що порівняно з агроценозами України, ентомопатогенні нематоди природно-заповідного фонду зустрічаються рідше та представлені лише одним родом *Steinernema*.

Зауваження. Не завжди вдалою виявилась спроба авторі відобразити зведені матеріали в табличному форматі. Зокрема, представлені у роботі індекси парної подібності сіквенсів обраних генетичних маркерів (Табл. 4.2-4.4) поділені автором на групи лише за принципом подібності (червоним кольором виділено результати в діапазоні 99,9-100,0 % подібності, жовто-гарячим – 99,5-99,8 %, жовтим – 99,0-99,4 %, зеленим – зовнішню групу), тоді як поза увагою залишився рівень достовірності одержаних результатів.

На стор. 69 в підрозділі «Молекулярно-генетичний аналіз» автором зазначено, що «сіквенси виділених культур ЕПН» представлено в додатку Г, тоді як по факту він означений як додаток В. Крім того – не зрозуміло сіквенси якої ділянки рибосомального кластеру ДНК *S. feltiae* аналізуються автором в даному випадку: ITS1-5.8S-ITS2 рДНК чи D2-D3 28S рДНК? Відповідь на це запитання відсутня як в тексті, так і підписах до таблиць, рисунків і додатків підрозділу (Рис. 4.8, Табл. 4.4, Додаток В).

На сторінці 70 назва рисунку 4.8 звучить як «Філогенетичні зв'язки всередині групи *S. feltiae* України». Вочевидь, перед словом «України» автором загублено слова «виділених на території».

Підрозділ 4.2.2. автор завершує висновком «…про необхідність використання для побудови адекватного філогенетичного дерева сучасніших молекулярно-генетичних методів дослідження, зокрема клонування даної ділянки рДНК». Проте клонування тієї чи іншої ділянки ДНК є лише допоміжним інструментом у збільшенні кількості копій попередньо обраних, так званих «маркерних» ділянок геному. Тоді як в контексті проведених автором досліджень мова йде скоріше про необхідність вибору більш інформативних генетичних маркерів як таких та методів їх аналізу.

Висновки викладені автором лаконічно та конструктивно і відповідають змісту проведених дисертаційних досліджень та їхньому аналітичному осмисленню. Проте заключення про різницю у траплянні ентомопатогенних нематод в 4 рази менше в ценозах природно-заповідного фонду проти агроценозів України здається не зовсім переконливим, оскільки дослідниками аналізувались вибірки відмінного розміру (434 ґрунтові проби за результатами досліджень автора в ценозах природно-заповідного фонду України та 837 ґрунтових проб в агроценозах країни (Сігарьова та ін., 2009; Kharchenko та ін., 2012)). Існує ймовірність, що при збільшенні кількості аналізованих ґрунтових проб з ценозів природно-заповідного фонду у два рази зросте і кількість виявлених проб, що заселені ентомопатогенними нематодами. В такому випадку відмінність у траплянні ентомопатогенних нематод в ценозах природно-заповідного фонду проти агроценозів України може скоротитись з 4 до 2 разів.

Крім представлених зауважень, в роботі зустрічаються інші помилки, невдалі вислови та русизми, зокрема:

Стор. 7 SD – середнє квадратичне відхилення (st**та**ard deviation);

Стор. 8 glcdl – (gl**та**ula caudalis) хвостова залоза;

Стор. 11 «окремихізолятів»

Стор. 12 «Загальноприйнято»

Стор. 15 «В Ленінградській (**РРФСР**)»

Стор. 19 «групу Steinernematidae було поділено на 5 клад ( )»

Стор. 21 «Стравохід рабдитидний з дещо звуженим метакорпусом, з вузьким перешийком, оточеним нервовим кільцем, та великим базальним бульбусом зі **скоротливим** клапаном».

Стор. 29 «Більшість **осадів**»

Стор. 31 «Зона характеризується тим, що первинні ліси та лучні степи мало **збереглися,–** оранки займають 70-80 % сільськогосподарських угідь…»

Стор. 35 «На північному макросхилі сформувалися **низбкогірні** лісолучні (дубово-лучні), середньогірні широколистяно-лісові (дубові) і шпильчаково-широколистяні (буково-соснові) ландшафтні комплекси».

Стор. 47 «…рідину **зі** мікропробірки для збирання кожного разу видаляли…»

Стор. 67 «Досліджені десять ***самиці*** *II генерації»*

Стор. 88 «…в основний отвір **внесено вносили** ІЛ H. Bacteriophora…»

Стор. 106 «Їх морфометричні показники надані у **таблиці Таблиця** 4.19.»

Стор. 119 «62. HIRAO, A., EHLERS, R.-U., STRAUCH, O. 2010. Life cycle та population development of the entomopathogenic nematodes Steinernema carpocapsae та S. feltiae (Nematoda, Rhabditida) in monoxenic liquid culture. Nematology, 12, 201210».

Однак ці зауваження не применшують наукового і практичного значення доробку дисертанта.

Загальний висновок. Враховуючи суть, практичне значення та новизну одержаних результатів досліджень, вважаю, що дисертаційна робота Яковлєва Єгора Борисовича "Ентомопатогенні нематоди (Nematoda: Rhabditida) в природних екосистемах України" відповідає чинним вимогам, які висунуті до кандидатських дисертацій Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року № 567 і заслуговує високої оцінки, а її автор – присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.25 – паразитологія, гельмінтологія.

Заступник академіка-секретаря
Відділення землеробства, меліорації та механізації
Національної академії аграрних наук України,
доктор біологічних наук, старший наук. сп.,
член-кореспондент НААН **Л.А. Пилипенко**

Підпис Пилипенко Л.А. засвідчує:
Заступник головного вченого секретаря
Національної академії аграрних наук України **Л.О. Тимченко**