

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу *Ковтуна Андрія*

Миколайовича

на тему «**Видовий склад, поширення ентомопатогенних нематод в агроценозах України**», представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 16.00.10 – ентомологія

Серед екологічної групи ентомонематод, на особливу увагу заслуговують представники двох родин – *Steinernematidae* Chitwood et Chitwood, 1937 та *Heterorhabditidae* Poinar, 1976 (*Nematoda: Rhabditida*), які завдяки їх мутуалістичному зв'язку із кишечними бактеріями-симбіонтами з родів *Xenorhabdus* Thomas, Poinar, 1979 emend. Thomas, Poinar, 1983 та *Photorhabdus* Boemare et al., 1993 (γ -*Proteobacteria: Enterobacteriaceae*) здатні знищувати шкідників, що дозволяє використовувати їх як біоінсектициди у агроценозах.

Але не дивлячись на те, що сьогодні ентомопатогенні нематоди застосовують у захисті рослин у багатьох країнах світу, в Україні до цих пір залишаються мало вивченою групою нематод-рабдитид і не мають великого практичного значення у вітчизняному мікробіологічному захисті сільськогосподарських культур.

Успішне впровадження та раціональне використання ентомопатогенних нематод, як біоагентів для контролю чисельності шкідливих видів фітофагів в агроценозах є неможливим без базових знань щодо фауністичних даних, доповнення і уточнення даних щодо поширення окремих їх видів.

Саме тому актуальними є питання пошуку, виявлення, ідентифікації місцевих видів та ізолятів ентомопатогенних нематод, що є одним із вирішальних напрямків для створення лабораторної культури ентомонематод та подальшим вивченням ентомоцидної активності ЕПН щодо комах у лабораторно-польових дослідах, а також з'ясування чинників та умов, що визначають характер поширення їх в агроценозах, яким і присвячена тема дисертаційної роботи.

Обґрунтованість наукових положень і висновків, сформульованих у дисертації підтверджується коректною організацією теоретичних, аналітичних досліджень і експериментальних підходів та методів, статистичною обробкою даних. Наукові положення, висновки та рекомендації, висвітлені в дисертаційній роботі, ґрунтуються на фактичному матеріалі. Логічне узагальнення нових знань і послідовність викладення матеріалу забезпечують достовірність та обґрунтованість отриманих результатів дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що у дисертаційній роботі висвітлено результати дослідження фауни ентомопатогенних нематод (*Nematoda: Rhabditida: Steinernematidae et Heterorhabditidae*), їх поширення в агроценозах України та ентомоцидну активність в якості біоагентів проти ґрунтових комах-шкідників (*Scarabaeidae*), а також запропоновано концептуальний системний підхід до проведення ентомонематологічного моніторингу агроценозів.

Вперше:

Виявлено локалітети ентомопатогенних нематод *Steinernema* spp. (*Steinernematidae*) та *Heterorhabditis* spp. (*Heterorhabditidae*) на Поліссі – у Житомирській та Чернігівській областях України, що суттєво поглиблює знання

про специфіку умов існування місцевої нематодофауни;

Зареєстровано явище гіперпаразитизму у тілі загиблих комах *Galleria mellonella* L., 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) в природних умовах при виявленій мікст-інфекції, а саме – ентомофаго-нематодній паразитарній асоціації;

Запропоновано науково-практичні підходи та розроблено концептуальну схему ентомонематологічного моніторингу в агроценозах.

Розширено і доповнено дані щодо місцевої нематодофауни, а також особливостей поширення окремих видів ентомопатогенних нематод (Nematoda: Rhabditida) на території Полісся і Лісостепу України.

Подальшого розвитку набули:

- дослідження щодо пошуку популяцій аборигенних видів ентомопатогенних нематод (Steinernematidae, Heterorhabditidae) для ефективного використання, як перспективних мікроорганізмів-біоагентів проти шкідливих видів комах.

Повнота викладення одержаних результатів у наукових працях. Основні результати теоретичних і експериментальних досліджень за темою дисертації опубліковано в 16 наукових праць, з них: 6 наукових статей у фахових виданнях України, що входять до категорії «А» та «Б»; одна стаття у науковому періодичному виданні іншої держави; 9 тез у матеріалах конференцій.

Ідентичність змісту автореферату і основних наукових положень дисертації. У тексті автореферату відображено основні положення, зміст, результати і висновки виконаної Ковтуном А. М. дисертаційної роботи. Зміст автореферату відтворює основні положення дисертації.

Аналіз основного змісту дисертаційної роботи. Дисертаційна робота представлена до захисту українською мовою, оформлена згідно чинних вимог і структурно містить загальноприйняті компоненти: анотацію, вступ, п'ять розділів, висновки, рекомендації виробництву, список літератури та додатки. Включає перелік скорочень, умовних позначень, символів, одиниць і термінів. Робота викладена на 209 сторінках та ілюстрована 26 рисунками і містить 11 таблиць та 4 додатки. Список літератури включає 160 джерел, з них 57 кирилицею.

Під час вивчення матеріалів дисертації, аналізу наукових публікацій автором не було виявлено ознак порушення академічної доброчесності.

Отже, дисертація, Ковтуна А. М. є самостійною науковою роботою. Використання ідей, результатів текстів інших авторів мають належні посилання на відповідні джерела.

Дисертаційна робота виконана в рамках тематики лабораторії нематології Інституту захисту рослин НААН за завданням «12.01.00.21.П. Розробити превентивні та контролюючі протинематодні заходи в системі фітосанітарної безпеки» (державний реєстраційний номер: 00116U003530) у 2015-2018 рр.

У **вступі** автор наводить загальну характеристику роботи відповідно до вимог викладення актуальності досліджень, чітко формулює мету і завдання досліджень, об'єкт, предмет. Наукову новизну дослідження і практичне використання викладено послідовно і логічно. Матеріали дослідження пройшли ретельну апробацію та опубліковані в знаних вітчизняних і зарубіжних виданнях. Вказано авторський доробок до колективних праць.

У розділі 1. «Ентомопатогенні нематоди з родин Steinernematidae та Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida), як об'єкт дослідження» автор наводить результати теоретико-аналітичних досліджень. Із посиланням на літературні джерела проаналізовано вітчизняну та зарубіжну наукову літературу щодо проблем екологічних ризиків у галузі сільського господарства. Проаналізовано та подано сучасну таксономію та систематику ентомопатогенних нематод (Steinernematidae та Heterorhabditidae), характерні особливості їх діагностування. Проведено аналіз географічного поширення ентомопатогенних нематод на глобальному та континентальному рівнях. Розглянуто роль ентомопатогенних нематод, як природних регуляторів комах-шкідників в агроценозах, висвітлено їх біолого-екологічні особливості.

У розділі 2 автор досить чітко і детально наводить місце, матеріали та методики проведення досліджень».

При виборі місця проведення досліджень в основу роботи покладені матеріали фрагментарних обстежень агроценозів (посівні площі сільськогосподарських культур, багаторічні сільськогосподарські насадження – плодові сади, плантації декоративних насаджень) у літньо-осінній період 2016–2021 рр.

Матеріалом для досліджень слугували проби ґрунту, ґрунтові «живі» пастки, зразки тест-комах *Galleria mellonella* L., 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) та потенційних комах-хазяїв різних видів (Coleoptera: Elateridae, Tenebrionidae, Melolonthinae; Lepidoptera: Noctuidae), інвазійні личинки та дорослі особини ентомопатогенних нематод (Nematoda: Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae), а також інші ентомопатогенні організми (Fungi, Bacteria, Insecta), які спричиняли різні інфекційні та паразитарні хвороби різної етіології.

Методики проведення досліджень. Для проведення різного роду експериментальної роботи з ентомопатогенними нематодами, проводили культивування жертв – комах-хазяїв в лабораторних умовах.

Для виявлення ентомонематод використовували три базові способи: безпосередній відбір проб ґрунту, закладання ґрунтових «живих» пасток та збір потенційних комах-хазяїв. Видовий склад виявленої ґрунтової ентомофауни визначали в лабораторних умовах за допомогою визначників та консультувались з фахівцями Інституту захисту рослин НААН.

Диференціювання нематодозних захворювань комах, викликаних ентомопатогенними нематодами, здійснювали на підставі макроскопічного аналізу.

З метою ізоляції ентомопатогенних нематод із відібраних проб ґрунту застосовували метод біотестування на личинках великої воскової молі *G. Mellonella*, а виділення ентомопатогенних нематод із загинлих тест-комах з симптомами нематодного ураження проводили за застосування пастки Уайта.

Для отримання різних стадій розвитку ентомопатогенних нематод проводили штучне інфікування – личинок воскової молі *Galleria mellonella* L., 1758 в лабораторних умовах.

Ідентифікацію ізольованих ентомопатогенів (на родовому/видовому рівні) здійснювали по зовнішньому вигляду загинлих від них тест-комах *G. mellonella*, а також за особливостями морфолого-морфометричних ознак інвазійних личинок (L3), самців (♂), самиць (♀) чи гермафродитних особин I-ї та II-ї генерацій

ентомопатогенних нематод (Steinernematidae, Heterorhabditidae) методами світлової мікроскопії під мікроскопом Carl Zeiss Primo Star із використанням системи аналізу зображень ToupView 3.7 (for Digital Camera). при загальному збільшенні $\times 100$ – 1000 та спеціальних визначників.

Дослідження інсектицидної дії виявлених ізолятів ентмопатогенів *Steinernema* sp. щодо цільових комах-шкідників – личинок західного травневого хруща *Melolontha melolontha* L., 1758 проводили у лабораторних умовах за обприскування суспензією нематод попередньо анестезованих дослідних комах. Для порівняння використовували біологічний препарат Entonem (Koppert Biological Systems, Нідерланди) на основі ентмопатогенної нематоди виду *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding, 1982.

Математично-статистичну обробку отриманих даних здійснювали методами варіаційної статистики, за використання програм обробки даних «SPSS Statistics 17.0» та «Microsoft Excel 2016». Аналіз тенденцій основних досліджуваних показників у відповідних порівнюваних групах проводили за допомогою розрахунку U-критерія Манна-Уїтні (при $p \leq 0,05$).

У розділі 3. «Результати досліджень та їх обговорення». Частота трапляння нематод (RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE, HETERORHABDITIDAE) серед ентмопатогенних організмів в агроценозах України здобувач на основі проведених досліджень встановив, що серед 312 проаналізованих проб (220 ґрунтових проб + 92 «живих» пасток), відібраних в агроценозах різних регіонів України: Житомирська обл., Чернігівська обл., Київська обл., Вінницька обл., Хмельницька обл., Черкаська обл. та Одеська обл. – 30,5 % виявились позитивними щодо ентмопатогенних організмів різної етіології (Nematoda, Fungi, Bacteria, Insecta), які викликають інфекційні та паразитарні захворювання комах у формі моно- та змішаної (мікст) інфекцій.

Також окрім нематодної інфекції, в досліджуваних пробах діагностовано численні мікози: види із роду *Beauveria* Vuill., *Metarhizium* Sorokin та *Akanthomyces* на які сумарно припадає 8 % позитивних проб; бактеріози склали 3%. Відмічено випадки зараження ентмозами, які склали – 2%. Змішана інфекція виявлена у 2,5 % від загальної кількості досліджених проб, з найвищим показником ураження комах *G. mellonella* при нематодозі із мускардінозом.

Автор стверджує про явище гіперпаразитизму в природних умовах за ентмофаго-нематодної паразитарної асоціації при нематодозі із ентмозом, оскільки личинки паразитичних мух, які заразили комах *G. mellonella*, у свою чергу, інфікувалися ентмопатогенними нематодами у тілі загиблої комахи.

Не менш актуальним і складним залишається питання частоти зараження ентмопатогенними нематодами шкідливих комах та їх гостальної специфічності (харчової спеціалізації) у біоценозах. Лабораторний аналіз зібраних та відловлених в природних умовах ґрунтових комах (>100 екземплярів) на предмет їх зараження ентмопатогенами – не виявив в них інвазій, що пов'язано, у першу чергу, з малим обсягом вибірки комах.

Усі виявлені комахи, за деяким виключенням, згідно з даними літератури, потенційно могли бути хазяєвами для ентмопатогенних нематод.

При дослідженні заселеності агроценозів України ентмопатогенними нематодами (STEINERNEMATIDAE, HETERORHABDITIDAE) встановлено, що частота виявлення позитивних проб із ентмопатогенними нематодами, їх

родова різноманітність значно варіювали в залежності від місць обстежень, типу агрофітоценозу.

Результати нематологічних обстежень агроценозів засвідчили, що багаторічні насадження достовірно більше заселені ентомопатогенними нематодами у 4,8 разів ($U = 27,5$, z -показник = 2,29464 при $p < 0,05$), ніж посіви польових культур – 12,1 % проти 2,5 % (у % від загальної кількості досліджених проб), що можна пояснити специфічністю мікрокліматичних умов.

Найбільша кількість позитивних проб, в яких виявлено ентомонематод, припадає на багаторічні насадження (82,6 %); в меншій мірі в ценозах різноманітних польових культур (17,4 %).

Представники роду *Steinernema* помітно переважали над *Heterorhabditis* (у співвідношенні 1,5:1), але виявлена різниця не була статистично достовірною ($U = 30,5$, z -показник = 0,10502 при $p < 0,05$) і носила характер тенденції. Слід зазначити, що *Steinernema* spp. поширені в різних агроценозах, тоді як *Heterorhabditis* spp. зустрічалися виключно в плодових садах і хвойних декоративних багаторічних насадженнях.

Усі ізоляти ентомопатогенних нематод на основі дослідження основних морфолого-морфометричних параметрів віднесено до трьох видів: два представники – *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) Wouts et al., 1982 та один вид – *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976. Наведено список таксонів надвидового рангу ентомопатогенних нематод виявлених в агроценозах України.

Встановлено, що ентомопатогенні нематоди проявляють неабияку мінливість за багатьма проаналізованими морфометричними характеристиками та індексами (M (min-max), мкм), що ускладнювало процес ідентифікації окремих ізолятів, зокрема це стосується *Steinernema* ex gr. «*glaseri*».

З огляду на те, що у фауні України виявлений єдиний ідентифікований представник з групи «*glaseri*» – *Steinernema arenarium* (Artyukhovsky, 1967) Wouts та ін., 1982, з високим ступенем імовірності автор припускає, що виявлений ним ізолят належить саме до групи «довготілесних нематод» *Steinernema* «*glaseri*-group», але уточнення того, чи виявлений ізолят *Steinernema* ex gr. «*glaseri*» є конспецифічним із *S. arenarium*, виявленим Yakovlev et al., чи навіть новим видом, потребує більш детального дослідження із застосуванням генетично-молекулярних методів, а також проведення експериментів по схрещуванню.

Виявлені в Чернігівській та Житомирській області локалітети ентомопатогенних нематод є новими місцезнаходженнями для видів *S. carpocapsae*, *Steinernema* ex gr. «*glaseri*» та *H. bacteriophora* на території України.

У розділі 4. «Оцінка ентомоцидної активності ентомопатогенних нематод (Steinernematidae) щодо ґрунтових комах-шкідників (Scarabaeidae)» присвячений за результатами багаторічних досліджень ідентифіковано види ентомопатогенних нематод (*Steinernema carpocapsae*, *Steinernema* «*glaseri*»-group та *Heterorhabditis bacteriophora*), які згідно літературних даних, є одними з найбільш інтенсивно досліджуваних видів для використання в біологічному захисті рослин у якості біоагентів, і мають наукове та комерційне значення.

Проведеними дослідженнями біопотенціалу аборигенного ізоляту *Steinernema* sp. DD-5 щодо місцевих ґрунтових шкідливих комах-фітофагів, а саме личинок західного травневого хруща, у порівнянні з комерційним біологічним препаратом Entonem (Koppert Biological Systems, Нідерланди) на основі виду

Steinernema feltiae у лабораторних умовах за штучного інфікування (з розрахунку 100 інфекційних личинок/комаху) встановлено, що за показниками біологічної ефективності та репродукційного потенціалу місцевий ізолят не поступався комерційному препарату.

Встановлено, що 100 % загибель комах відмічали на 3-й день (препарат Entonem) і 4-й день (місцевий ізолят *Steinernema* sp.); кількість особин інвазійних личинок ентонематод, які евазували із однієї комахи також істотно не відрізнялася.

За даними статистичного аналізу (U-критерій Манна-Уїтні; $p > 0,05$) встановлено достовірну зміну цільових показників репродуктивного потенціалу у 4-ту декаду обліку серед дослідних варіантів «*Steinernema* sp. DD-5» і «*S. feltiae*, Entonem» ($U = 4$, z -показник = -2.16173 при $p < 0,05$), у решті випадків достовірної залежності між варіантами дослідів не виявлено.

У розділі 5. «Ентонематологічний моніторинг, як складова інтегрованих систем захисту рослин» дисертант висвітлив особливості проведення моніторингу нематод – патогенів комах (Nematoda: Rhabditida) в агроценозах. На основі розробленої системи моніторингу фітопаразитичних нематод здійснено трансфер нематологічного моніторингу і створено підґрунтя для принципово нової концептуальної схеми – ентонематологічного моніторингу нематод – патогенів комах (Nematoda: Rhabditida) – від виявлення й ізоляції (виділення) ентомопатогенів, до аналізу (оцінки) предикторів, необхідних для збереження і підвищення ефективності їх в агрофітоценозах. Окремі етапи якого адаптовані з врахуванням біолого-екологічних особливостей цільових ентомопатогенів.

Весь процес моніторингу включає десять послідовних етапів в чіткій послідовності.

Висновки в дисертаційній роботі аргументовані, сформульовані лаконічно та відповідають поставленій меті та завданням.

Дискусійні положення та зауваження по роботі. Водночас, за позитивної оцінки роботи до дисертанта є деякі питання, зауваження та побажання. Вважаю за необхідне вказати на окремі недоліки, котрі необхідно вирішувати при подальших дослідженнях:

1. Який принцип покладено в основу місця відбору ґрунтових проб у різних областях України.
2. Визначення видового складу нематодів за запропонованою методикою не викликає сумніву, але бажано було б провести ідентифікацію за ПЛР.
3. Потребує обґрунтування, як виділені місцеві ізоляти ентомопатогенних нематод *Steinernema* sp. культивували на гусеницях галерії без бактерій – симбіонтів, адже тільки завдяки їх мутуалістичному зв'язку із кишковими бактеріями з родів *Xenorhabdus* Thomas підтримується їх популяція і залежить патогенність.
4. Дисертаційна робота виконана в рамках тематики лабораторії нематології Інституту захисту рослин НААН у 2015-2018 рр., але наведені ще результати досліджень, які продовжувалися до 2021 р. (рис. 3.1; 3.4; табл. 3.2). Яким чином і де проводилися ці дослідження.
5. Потребує уточнення, як проводив здобувач ідентифікацію грибних патогенів: збудників білої *Beauveria* Vuill. і зеленої *Metarhizium* Sorokin

мускардин, а також види із роду *Akanthomyces* Lebert (рис. 3.1). Хто підтверджував видову належність? У розділі 2 ці методики не наведені.

6. Аналогічно, за аналізом зовнішнього вигляду загиблих тест-комах автор стверджує, що це дозволяє судити про бактеріальний характер захворювання. Ідентифікацію і підтвердження бактеріальної інфекції необхідно проводити згідно загальноприйнятих методик, що достовірно підтвердить цей вид інфекції.

7. У кінці розділу 1 необхідно обґрунтувати доцільність проведення досліджень з обраної теми дисертаційної роботи, вказати, що уже вивчено і що необхідно дослідити.

8. Досить часто зустрічаються невдалі терміни і повторення у тексті, зокрема: «послужити», «комахи-хазяїви»; «найцікавішою»; «немислима»; «найдоцільніші», «нормальна життєздатність».

Проте, відмічені зауваження та побажання не зменшують значення виконаної багатопланової роботи, не знижують її наукової новизни та практичної цінності і можуть лише бути предметом наукової дискусії під час захисту дисертації.

Загальна оцінка роботи. Дисертаційна робота **Ковтуна Андрія Миколайовича** на тему «Видовий склад, поширення ентомопатогенних нематод в агроценозах України» є самостійною, логічно впорядкованою, завершеною науковою працею, виконана на актуальну тему і відповідає паспорту спеціальності. Отримані результати відзначаються науковою новизною та прикладною спрямованістю, в сукупності вирішують поставлену проблему і мають вагомий вклад у методологію ентомології.

За своєю актуальністю, новизною, значним обсягом виконаних досліджень, достовірністю одержаних результатів, обґрунтованістю висновків, належним оформленням, дисертаційна робота **Ковтуна Андрія Миколайовича** на тему «Видовий склад, поширення ентомопатогенних нематод в агроценозах України» відповідає паспорту спеціальності 16.00.10 – Ентомологія і вимогам рівня наукової кваліфікації здобувача, що назначено у Порядку присудження наукового ступеню, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від № 567 від 24.07.2013 р., а її автор Ковтун Андрій Миколайович заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук зі спеціальності 16.00.10 – ентомологія.

Офіційний опонент:

доктор сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник,
заступник директора
Інститут захисту рослин НААН



Ганна ТКАЛЕНКО

