

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию **Антонец Марии Евгеньевны**
«Идентификация и сравнительный анализ генетических последовательностей
вирусов на основе геномных и транскриптомных данных колорадского жука
(*Leptinotarsa decemlineata*)»,

представленную к защите в диссертационный совет 24.1.239.01 при ИЦиГ СО РАН
на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
1.5.8. – математическая биология, биоинформатика (биологические науки)

Актуальность темы диссертационной работы

Метагеномный подход революционизировал вирусологию, позволяя с высокой чувствительностью и эффективностью выявлять и изучать вирусное разнообразие без необходимости предварительного культивирования. Комбинирование платформ короткого и длинного прочтения, совместно с развитыми биоинформатическими конвейерами, позволяет получать полные геномные последовательности новых вирусов и определять их филогенетическое положение. Практическое применение этих методов может привести к открытию новых агентов биологического контроля, что позволит решить серьёзные сельскохозяйственные проблемы и уменьшить загрязнение окружающей среды пестицидами.

Метагеномные исследования позволяют выявлять не только известные, но и ранее неизвестные вирусы. В отличие от традиционных методов, которые ограничены культивируемыми микроорганизмами и требуют знания морфологии вирусной частицы, метагеномика предоставляет информацию на уровне нуклеотидных последовательностей. Это позволило существенно расширить понимание вирусного разнообразия и привело к открытию целых семейств вирусов, известных исключительно по геномным данным. Одним из первых был изучен порядок Crassvirales – это порядок бактериофагов, которые связаны с вирусом, обнаруженным в результате компьютерного анализа метагеномных данных кишечника человека в 2014 году. Далее были исследованы семейства REP вирусов – *Genomoviridae*, *Redondoviridae* и др.

Открытие вирусов, поражающих колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*), имеет значительное практическое значение для разработки

биологических методов борьбы с этим вредителем. Традиционные химические пестициды привели к развитию устойчивости у жуков, тогда как энтомопатогенные вирусы могут представлять экологически безопасную альтернативу. Препараты на основе семейства *Baculoviridae* уже успешно применяются для борьбы с насекомыми-вредителями отряда *Lepidoptera*, и новые открытия в области вирома колорадского жука указывают на перспективность разработки подобных биопрепаратов. В последние годы во всем мире усилился интерес к использованию биологических препаратов для борьбы с колорадским жуком. Исследование вирома *Leptinotarsa decemlineata* это важная научная задача. В связи с вышесказанным, актуальность диссертационной работы Антонец Марии Евгеньевны не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Данное исследование представляет собой первый системный анализ вирусной составляющей генома и транскриптома колорадского жука. При обработке полученных последовательностей исключили данные, относящиеся к прокариотическим вирусам и гигантским вирусам. Выявленные вирусные фрагменты были отнесены к 32 таксономическим группам. Большинство обнаруженных последовательностей соответствуют патогенам членистоногих, также идентифицированы фитопатогенные вирусы. Предположено, что значительный пласт функционально не охарактеризованных белков в протеоме насекомых, в том числе у колорадского жука, может иметь вирусное происхождение.

Автором впервые документирована интеграция браковиральных последовательностей в геном колорадского жука, а также многочисленных эндогенных вирусных вставок из различных таксономических семейств.

Впервые зафиксирована активная вирусная инфекция у колорадского жука. Комплексный анализ генетического материала из предкуколок с летальной инфекцией неустановленной этиологии позволил реконструировать почти полные геномы двух возможных возбудителей — *Leptinotarsa iflavirus 1* и *Leptinotarsa solinvi-like virus 1*. Установлена возможная причинно-следственная связь между *Leptinotarsa iflavirus 1* и массовой гибелью популяции.

В публикации «Antiviral RNAi is preserved in dsRNA-resistant Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*)» вышедшей в феврале 2026 года отмечается, что на сегодняшний день у *L. decemlineata* идентифицированы только два РНК-вируса, принадлежащие к семействам *Solinviviridae* и *Iflaviridae* (Antonets et al., 2024). В данной публикации подтверждается существование этих вирусов в популяции *Leptinotarsa decemlineata* в Испании.

Новизна полученных автором научных результатов не вызывает сомнений.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Колорадский жук — опасный вредитель картофеля во всем мире. основным методом борьбы с ним является использование пестицидов. Однако эта стратегия часто оказывается неэффективной, так как вредитель выработал устойчивость почти ко всем препаратам. Были предложены методы борьбы с этим вредителями, основанные на РНК-интерференции, базирующиеся на доставке двухцепочечной РНК с комплементарностью последовательности к целевому транскрипту, кодирующему жизненно важный белок насекомых. Однако возникла популяция жука устойчивых и к таким препаратам.

Несмотря на значимость колорадского жука, как вредителя сельского хозяйства, его виром остается слабоизученной областью. Настоящая работа закладывает основу для молекулярного картирования вирусной экосистемы вредителя (*L. decemlineata*). Значимость теоретического плана заключается в том, что расширение знаний о вирусных патогенах этого организма и переносимых вирусных инфекциях позволит пролить свет на адаптационные механизмы, биоэкологические связи с антагонистами, микроорганизмами и растениями-хозяевами. Разработанный для исследования биоинформатический инструментарий имеет универсальный характер и может быть адаптирован для изучения виромов у других биологических объектов. С практической точки зрения исследование открывает перспективы разработки новых биопрепаратов на основе летальных энтомопатогенных вирусов, направленных на контроль популяций вредителя. Использование подобных препаратов может одновременно решить две стратегические задачи: минимизировать экономический ущерб от сельскохозяйственных вредителей и снизить техногенную нагрузку на экосистемы в результате отказа от химических пестицидов.

Общая характеристика диссертационной работы

Текст диссертации Антонец М.Е. изложен на 128 страницах, проиллюстрирована 16 рисунками, содержит 4 таблицы и 3 приложения:

- Приложение 1. Внешние ссылки на результаты работы;
- Приложение 2. Праймеры, использованные для подтверждения наличия определенных вирусных фрагментов и вставок в геноме *L. decemlineata*;
- Приложение 3. Количество контигов по видам, семействам и порядкам вирусов с медианной и максимальной длиной выравнивания, процентом идентичности выравнивания и длиной контига.

Диссертация написана в традиционном стиле и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, методы, результаты, заключение и список использованной литературы, который содержит список из 144 публикаций отечественных и зарубежных авторов.

Введение содержит все необходимые разделы: «Актуальность темы исследования», «Цели и задачи диссертационного исследования», «Научная новизна», «Теоретическая и практическая значимость исследования», «Методы диссертационной работы», «Положения, выносимые на защиту». «Апробация результатов и публикации», «Личный вклад автора», «Структура и объем диссертации». Все разделы написаны корректно и соответствуют тексту диссертации.

Глава «Обзор литературы» включает 4 раздела. Глава 1.1 (Метагеномные исследования) посвящена возможностям и ограничениям метагеномного подхода для изучения вирусов. Обсуждаются методы высокопроизводительного секвенирования, позволяющие открывать неизвестные микроорганизмы без культивирования, а также описываются инструменты и алгоритмы для анализа вирусных метагеномных данных: предварительная обработка прочтений, фильтрация, сборка контигов и идентификация вирусных последовательностей. Глава 1.2 (Колорадский жук) описывает биологию и экономическое значение вредителя. Освещаются его широкое распространение, генетическая пластичность, развитие устойчивости к инсектицидам и потребность в альтернативных методах контроля популяций, включая биологический контроль. Глава 1.3 (Вирусы насекомых) рассматривает основные семейства вирусов, поражающих насекомых:

Baculoviridae, *Iridoviridae*, *Polydnaviriformidae*, *Iflaviridae* и *Dicistroviridae*. Подробно анализируются их строение, жизненные циклы и потенциальное применение в качестве агентов биоконтроля или векторов для разработки биоинженерных инструментов. Глава 1.4 (Вирусы растений) посвящена вирусам растений, которые переносят насекомые, включая механизмы передачи и роль колорадского жука как переносчика растительных патогенов, угрожающих сельскохозяйственным культурам.

Раздел «Методы» полно представляет использованные методики и свидетельствует о большом объеме проделанной Антонец М.Е. работы. Раздел «Результаты» имеет 11 подразделов, в которых представлены результаты исследований. В этой главе описан поэтапный анализ вирусных последовательностей в базе данных по колорадскому жуку *L. decemlineata*. Сначала рассматривается анализ спектра k-меров и сборка метагенома с аннотацией вирус-позитивных контигов и распределением по типам, семействам и предполагаемым видам вирусов. Затем анализируются гипотетические и неохарактеризованные белки, показывается их обогащение в невирусных контигах. Далее описаны результаты выравнивания на вирусные геномы, оценка полноты референсного генома колорадского жука и поиск эндогенных вирусных элементов, включая браковирусоподобные фрагменты и их проверку ПЦР и секвенированием. Последние разделы посвящены выделению и полногеномной сборке двух новых РНК-вирусов (*Leptinotarsa iflavirus 1* и *Leptinotarsa solinvi-like virus 1*), их доменной организации, филогенетическому положению и детальному генетическому и филогенетическому анализу вируса картофеля S.

В главе «Обсуждение» систематизируются полученные данные о вирусном разнообразии, связанном с колорадским жуком и растениями-хозяевами. Выделяются группы вирусных последовательностей: вирусы насекомых, вирусы растений, ретровирусные и неретровирусные эндогенные элементы, а также неклассифицированные вирусы. Подробно обсуждаются новые *Leptinotarsa iflavirus 1* и *Leptinotarsa solinvi-like virus 1*, их возможная роль в гибели личинок и потенциал для биоконтроля этого вредителя. Анализируются данные о вирусах насекомых, подчеркивается сложность разграничения экзогенных и эндогенных вирусных элементов. Для фитопатогенных вирусов обсуждается роль колорадского

жука как их потенциального переносчика, с акцентом на необходимость прямых экспериментов по передаче вируса. Отдельно рассматриваются эндогенные вирусные элементы, особенно браковирусоподобные последовательности, интерпретируемые как свидетельство древней горизонтальной передачи и недооцененной распространенности таких элементов у жесткокрылых.

В главе «Заключение» суммированы полученные автором результаты. Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам, они закономерно вытекают из полученных результатов, четко сформулированы и полностью обоснованы.

Автореферат адекватно отражает основные результаты диссертационной работы. По теме диссертации опубликованы 2 статьи в научных журналах; результаты неоднократно представлялись на научно-практических конференциях. При этом за последние 3 года Антонец М.Е. была соавтором восьми научных публикаций в международных высокорейтинговых журналах, посвященных изучению ВИЧ, вируса гриппа и Алонгшан вируса; три из этих публикаций посвящены изучению метагенома колорадского жука.

В целом, диссертация написана очень ясно и логично, аккуратно оформлена, содержит все необходимые рисунки и таблицы, иллюстрирующие полученные результаты.

Замечания к диссертационной работе

Замечания к данной работе незначительны и имеют технический или дискуссионный характер. Можно отметить наличие очень незначительного количества грамматических ошибок и опечаток.

Можно сделать замечание широкому использованию автором термина «гомология» для сходства нуклеотидных или аминокислотных последовательностей. Данный термин встречается 69 раз. Однако понятие «гомология» может использоваться только для генетического материала организмов, имеющих общее происхождение. В случае отсутствия доказательств наличия общего предка следует говорить о сходстве последовательностей.

На странице 64 имеется ошибка в количестве контигов. Автор пишет «В этой таблице содержится информация о 13 314 уникальных контигах: на долю

надцарства Eukaryota приходится 13 113 уникальных контигов, на долю надцарства Bacteria – 6 220, Archaea – 269, на долю вирусов – 3 137 контигов.

Антонец М.Е. приводит на всех филогенетических деревьях индексы поддержки ≥ 70 %. Это может ввести читателя в заблуждение, так как автор использовал алгоритм UFBoot. При этом методе статистически значимы значения поддержки ≥ 95 %. Однако это замечание не умаляет высокую надежность полученных автором результатов.

Все замечания не являются принципиальными с точки зрения полученных результатов и не снижают ценности проделанной работы,

Достоверность полученных результатов, степень обоснованности научных положений и выводов диссертационной работы

Достоверность полученных результатов определяется анализом большого объёма экспериментальных данных по секвенированию генетического материала *Leptinotarsa decemlineata*. Антонец М.Е. использовала различные биоинформатические методы и программы, методы статистического анализа. Основные положения, выносимые на защиту, и выводы логично вытекают из полученных результатов. Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Антонец Марии Евгеньевны «Идентификация и сравнительный анализ генетических последовательностей вирусов на основе геномных и транскриптомных данных колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*)», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, является завершённой квалификационной научно-исследовательской работой.

Актуальность поставленных и решенных в ходе диссертационной работы задач, большой объем и качество проведенных научных исследований, новизна и высокая научно-практическая значимость полученных результатов, обоснованность приводимых выводов позволяют заключить, что представленная диссертационная работа полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, перечисленным в п. 9 "Положения о присуждении ученых степеней" от 24.09.2013

№842 в текущей редакции, а ее автор, Антоненц Мария Евгеньевна, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: по специальности 1.5.8. – математическая биология, биоинформатика (биологические науки).

В.н.с лаборатории молекулярной микробиологии
ФГБУН ИХБФМ СО РАН,
e-mail: babkin@niboch.nsc.ru
Тел. +7 (383)363-51-57

д.б.н. Игорь Викторович Бабкин

27 января 2025 г.



И.В. Бабкин

Подпись И. В. Бабкина заверяю
Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН к.б.н.



Е. Б. Логашенко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН),
Новосибирск, 630090, пр-т академика Лаврентьева, д.8.
Тел. +7(383)363-51-50; e-mail: niboch@niboch.nsc.ru; www.niboch.nsc.ru