

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертацию Косман Елены Сергеевны
«Экспрессия генов иммунного ответа вощинной огневки *Galleria mellonella*
Linnaeus и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say при развитии
грибных и сочетанных инфекций»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.14 – энтомология

Актуальность темы диссертационной работы.

Известно, что некоторые виды насекомых приносят огромный вред сельскохозяйственным культурам, и использование только химических средств борьбы с такими видами не всегда успешно. С одной стороны, у насекомых может развиваться устойчивость к инсектицидам, а с другой стороны, широкое применение неспецифических химических инсектицидов крайне негативно отражается на так называемых «полезных» насекомых, например опылителей, а также на состоянии окружающих биоценозов в целом. Вот почему поиск и изучение биологических способов борьбы с насекомыми-вредителями, способными исключить или хотя бы снизить применение химических инсектицидов, крайне важен. Перспективными агентами, способными осуществлять экологически безопасный контроль численности насекомых-вредителей, являются энтомопатогенные грибы.

Энтомопатогенные грибы проникают через покровы членистоногих, вызывая микозы и гибель насекомых. При этом в организме инфицированного насекомого развивается ответные иммунные реакции. Однако, ряд аспектов этого процесса остается малоизвестным – какие гены задействованы в этом процессе у конкретных видов насекомых; как отвечает система «насекомое и его симбиотическая микробиота» на грибную инфекцию; какие абиотические и биотические факторы среды влияют на баланс в системе «гриб – насекомое – микробиота» и т.д. В связи с вышесказанным, актуальность диссертационной работы Косман Е.С. не вызывает сомнений. Представленная диссертационная работа посвящена изучению влияния инфекции энтомопатогенными грибами на экспрессию генов, вовлеченных в иммунный ответ насекомого. Эта работа в значительной степени восполняет этот пробел в данных об особенностях иммунного ответа насекомого на микоинфекцию и раскрывает новые молекулярные механизмы патогенеза микозов.

Научная новизна и практическая значимость работы.

В диссертационной работе Елены Сергеевны проведен комплексный анализ зависимости исходов микозов от нескольких факторов: дозы патогена, токсинов природного происхождения и температуры окружающей среды. В результате, впервые показано, что у колорадского жука низкие дозы микопатогена *Beauveria bassiana* активируют антибактериальные сигнальные пути, сдерживая опережающее

размножение энтеробактерий и обеспечивая классическое развитие микоза, тогда как высокие инфекционные дозы гриба подавляют эти механизмы, что вызывает бактериальный сепсис и гибель насекомого, и невозможность развития микопатогена. Обнаружен уникальный иммунный ответ у личинок воцинной огневки на введение яда паразитоида *Habrobracon hebetor* совместно с инфекцией микопатогена *Metarhizium robertsii* – индукция генов антимикробных пептидов, ингибитора апоптоза и белков теплового шока, что способствует развитию и этого микопатогена, и личинок паразитоида. Впервые показано, что тенуазоновая кислота подавляет иммунитет огневки (снижая экспрессию лизоцима и цекропина), что ведёт к пролиферации симбиотических бактерий. Также впервые продемонстрировано влияние температуры на исход инфекции микопатогеном – при 15 °С у личинок огневки, инфицированных *Cordyceps militaris*, усиливается антибактериальный ответ и ослабевает антигрибной, что благоприятствует развитию гриба; при 25 °С — обратная картина, ведущая к бактериозу.

Практическая значимость диссертационной работы Косман Е.С. определяется тем, что данные о влиянии дозы инфекции, наличия токсинов (тенуазоновая кислота), парализации паразитоидом и температуры среды определяют исход (микоз или бактериальный сепсис) и открывают возможность управления инфекционным процессом у вредителей на основе блокирования определенных иммунных реакций. Это, в свою очередь, необходимо для повышения эффективности методов биологического контроля в условиях роста резистентности членистоногих к химическим пестицидам, усилению экологических требований и климатических изменений. Данное исследование, углубляя фундаментальные знания о взаимодействии патогенов с насекомым-хозяином, является значимым для разработки экологически безопасных селективных методов защиты растений от экономически-значимых видов насекомых.

Структура и общая характеристика диссертационной работы.

Диссертация Косман Е.С. имеет традиционную структуру и содержит следующие главы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение и Выводы. Текст диссертации изложен на 97 страницах; он дополнен списком цитированной литературы, содержащим более 300 источников, а также Приложениями.

Во введении обоснована актуальность исследования; оно содержит все необходимые разделы, включая цели и задачи, научную новизну и практическую значимость, положения, выносимые на защиту и т.д.

Обзор литературы (названный почему-то Литературным обзором) касается широкого круга вопросов, имеющих отношение к тематике конкретной работы. В Обзоре дана общая характеристика микозов насекомых, указаны бактериальные

компоненты микробных сообществ, ассоциированных с насекомыми, и описаны механизмы резистентности насекомых к бактериальным и грибковым инфекциям. О современности сведений, изложенных в Обзоре, свидетельствует то, что более 40% из 285 ссылок – это публикации последних пяти лет.

В главе Материалы и методы представлено ясное и, в основном, детальное описание достаточно широкого спектра использованных в работе методик, включая статистические методы обработки данных.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из четырех частей, описывающих результаты разных аспектов работы соискателя. Ход исследований описан ясно и логично, результаты хорошо проиллюстрированы. Важно отметить, что ключевые результаты получены лично Еленой Сергеевной, т.к. основные эксперименты по изучению патогенеза инфекций, особенностей экспрессии генов, ассоциированных с иммунным ответом насекомого, а также обработка и анализ данных выполнена автором самостоятельно. Важно отметить, что каждая из четырех частей сопровождается содержательным обсуждением, в котором автор суммирует полученные в данном разделе результаты, подчеркивает их значимость и место в контексте современных данных. Собранные вместе, результаты отдельных разделов объединяются в единую концепцию баланса между классическим микозом и бактериальным сепсисом в зависимости от иммунного ответа хозяина. На основе синтеза результатов по исследуемым моделям сформулированы два положения. Особенно интересным представляется то, что реакции иммунитета хозяина в ряде случаев могут работать в пользу развития паразитического организма.

В целом, диссертация Косман Е.С. является классической научно-квалификационной работой. Цель и задачи исследования выполнены. Выводы, сделанные на основе полученных результатов, как и положения, выносимые на защиту, обоснованы. **Достоверность данных** диссертации обеспечена комплексным методическим подходом, сочетающим классические биотесты с молекулярно-генетическими и микробиологическими методами. Эксперименты выполнены с использованием репрезентативных выборок (не менее 30 особей на вариант) в трёх и более повторностях. Следует отметить, что результаты диссертации достаточно полно опубликованы (семь статей) в уважаемых научным сообществом, рецензируемых англоязычных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus и входящих в перечень ВАК. В одной публикации Елена Сергеевна является первым автором. Также результаты работы были представлены на трех всероссийских и международных конференциях. Текст автореферата полностью отражает ход исследования и основные положения диссертации.

Вместе с тем к работе имеется ряд замечаний и вопросов:

1. Обзор литературы никак не проиллюстрирован; нет ни рисунков, ни схем, ни таблиц, ни формул. Это существенно уменьшает его информативность.
2. В описании результатов 16S профилирования бактериальных сообществ отсутствует информация о том, из скольких насекомых/образцов делали библиотеки для NGS, и что анализировал автор. Сказано лишь (стр. 51), что «... 200 нг продукта ПЦР из каждого образца (смесь из трех технических повторений) объединяли и чистили ...». Остается неясным, что такое образец – сумма 30 насекомых или это что-то другое. Сколько повторов библиотек секвенировали?
3. Из результатов подглавки 3.1.2 (Анализ изменения бактериальных сообществ в различных тканях у личинок колорадского жука при остром и пролонгированном микозе) остается неясным, сохранилось бы доминирование бактерий рода *Citrobacter* в посмертной колонизации личинок колорадского жука (в результате острой инфекции), если бы насекомые были собраны в других локациях или в других сезонах. Это связано с тем, что не дано исчерпывающее описание коллекции экземпляров колорадского жука, использованной в данной работе.
4. Основная претензия к тексту – множество терминологических неточностей во Введении и Обзоре литературы. Не бывает «патогенезов насекомых», «грибных патогенезов», «патогенезов аскомицетов» и т.д. Следует корректно использовать термин «патогенез» (патогенез заболевания, вызванного тем-то, патогенез инфекции, протекающей в организме ...). Также следует использовать единообразную терминологию – «активированные кислородные метаболиты» или «активные кислородные метаболиты» (стр. 35). Если автор имеет в виду разные вещества, стоит это пояснить. Также следует в самом начале текста давать латинское и общеупотребимое название изучаемых организмов, как это принято в научной печати.
5. В таблицах 1 и 3 в колонке с названием «Гены» приведены названия продуктов этих генов, а в таблицах 2 и 4 названия генов приведены не общепринятым способом.
6. Стоит четко различать понятия «микробиом» (сумма геномов/фрагментов генов) и микробиота (сумма микроорганизмов) и правильно их использовать.

Вместе с тем, очевидно, что перечисленные замечания носят преимущественно дискуссионный или технический характер и не влияют на научную значимость полученных результатов.

Диссертация «Экспрессия генов иммунного ответа воцинной огневки *Galleria mellonella* Linnaeus и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say при развитии грибных и сочетанных инфекций» по актуальности, научной новизне, объему

проведенных исследований и практической значимости полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и отраженным в пунктах 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» в редакции, соответствующей постановлению Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года за № 842 с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 №723, от 21.04.2016 №335, 02.08.2016 №748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 №1024, от 01.10.2018 №1168, от 26.05.2020 №751, от 20.03.2021 №426, от 11.09.2021 №1539, от 26.09.2022 №1690, от 26.01.2023 №101, от 18.03.2023 №415, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Косман Елена Сергеевна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.14 – энтомология (биологические науки).

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник,

Заведующий лабораторией молекулярной микробиологии

Институт химической биологии и фундаментальной медицины

Сибирского отделения Российской академии наук

доктор биологических наук



Тикунова Нина Викторовна

специальности 03.00.03 молекулярная биология и 03.00.06 вирусология

630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

Тел (383) 363-51-57; e-mail: tikunova@lniboch.nsc.ru

Подпись д.б.н. Тикуновой Н. В.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Институт химической биологии и фундаментальной медицины

Сибирского отделения Российской академии наук

к.б.н. Логашенко Е.Б.

