

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ ВНИИБЗР,
к.б.н.

—A.M. Асатурова

1» октября 2019 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений» на диссертацию Оберемка Владимира Владимировича на тему: «Экологические основы контроля численности листогрызущих насекомых с применением ДНК-инсектицидов», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.08 – экология (биологические науки) и 06.01.07 – защита растений

Диссертационная работа Оберемка Владимира Владимировича посвящена важному экологическому вопросу разработки препаратов для контроля численности насекомых-вредителей, которые будут безопасными, доступными и одновременно эффективными в долгосрочной перспективе. Население мира будет увеличиваться и в течение следующих 30 лет может превысить 9 миллиардов, что приведёт к мировому спросу на продовольствие. Более интенсивное производство продовольствия потребует и более масштабного применения пестицидов, в том числе инсектицидов. Предполагается, что к этому времени использование пестицидов возрастёт в 2,7 раза по сравнению с началом столетия. При сохранении тенденции использования современных химических инсектицидов это подвергнет людей и окружающую среду значительно большей опасности и экологическим рискам.

Поиск избирательных путей контроля численности листогрызущих насекомых относится к одному из актуальных векторов изучения влияния антропогенных факторов, что помогает создавать принципы и практические меры, направленные на охрану живой природы, включая как видовой, так и экосистемный уровни. Избирательная регуляция численности видов листогрызущих насекомых на основе природных полимеров способна снизить токсикологическую нагрузку на экосистемы, которая сегодня прогрессивно нарастает в результате использования неизбирательных инсектицидов.

В данном направлении ведется разработка постгеномного подхода, который основывается на применении фрагментов природных полимеров – нуклеиновых кислот. В частности, разрабатываются контактные ДНК-инсектициды на основе коротких антисмысловых фрагментов генов, а также

препараты на основе двухцепочечных РНК-фрагментов. Идея разработки и применения таких препаратов заключается в посттранскрипционной инактивации экспрессии функционально важных генов с помощью техник применения антисмыловых олигонуклеотидов и механизма РНК-интерференции. Представленная диссертационная работа направлена на комплексное изучение ДНК-инсектицидов как препарата нового поколения для защиты растений.

Актуальность ее еще больше возрастает в связи с тем, что автор первым в мире предложил концепцию контактных инсектицидов на основе нуклеиновых кислот для защиты растений, что является новым способом контроля численности насекомых-вредителей, основанный на применении немодифицированных (природных) антисмыловых олигонуклеотидов.

Перед диссидентом поставлены вопросы совершенствования научно-методической базы исследований, обеспечивающей комплексное изучение влияния ДНК-инсектицидов на целевых насекомых-вредителей и нецелевые объекты, с применением методов экологии, генетики, биохимии, гистологии, органической и аналитической химии, разработку первых контактных ДНК-инсектицидов, оценку их биодеградации и перспектив развития данного направления исследований.

В работе присутствует высокая степень новизны и достоверности результатов проведенных экспериментов. Новыми, на наш взгляд, являются следующие положения диссертации:

- продемонстрирована эффективность контактных ДНК-инсектицидов в регуляции численности непарного шелкопряда на основе коротких антисмыловых фрагментов антиапоптозного IAP-3-гена его вируса ядерного полиэдроза (oligoRING-фрагмент) и гена, кодирующего 5,8S рРНК (oligoRIBO-11-фрагмент);
- показана избирательность действия ДНК-инсектицидов для ряда нецелевых организмов;
- у непарного шелкопряда впервые обнаружен антиапоптозный IAP-Z-ген, обладающий высокой степенью схожести с антиапоптозным IAP-3-геном ВЯП НШ, и пригодный для создания ДНК-инсектицидов;
- контактная обработка листьев мяты перечной антисмыловым ДНК-фрагментом oligoMER-11, комплементарного к мРНК ментонредуктазы, приводит к снижению содержание ментола и увеличению содержания ментона;
- обнаружен эффект повышения смертности непарного шелкопряда и шелкопряда-монашенки, заражённых ВЯП НШ и обработанных коротким антисмыловым фрагментом его антиапоптозного IAP-3-гена (oligoRING-фрагмент), что открывает перспективы в плане повышения эффективности действия бакуловирусных препаратов при помощи антисмыловых ДНК-олигонуклеотидов.

Результаты исследований диссидентта имеют высокую значимость для защиты растений, экологии, энтомологии,

молекулярной биологии. Разработаны и апробированы основные принципы создания ДНК-инсектицидов, полученные новые для науки биологические эффекты влияния антисмыловых олигонуклеотидов на клетки насекомых. Сформулированы рекомендации для применения в практике лесного хозяйства 2 ДНК-инсектицидов для контроля численности непарного шелкопряда.

Оберемок В.В. осуществил достойную аprobацию результатов работы. Результаты исследований были доложены на 23 конференциях международного, всероссийского и регионального уровней. Характерно то, что автор вынес на защиту наиболее интересные для экологии и защиты растений положения диссертации, имеющих исключительно важное значение для создания средств защиты растений, обладающих высокой таргетностью и высоким уровнем экологичности.

По материалам диссертации опубликовано 50 научных работ, в том числе 17 – в журналах из базы данных Scopus, из которых 5 журналов с импакт-фактором выше 2,5, включая высокорейтинговый журнал Scientific Reports, 2 главы книг, 4 патента на изобретение РФ.

Анализ диссертации.

Диссертация Оберемка В.В. имеет рациональную структуру, средняя по размерам, изложена на 259 страницах машинописного текста, содержит 18 таблиц и 83 рисунка, состоит из введения, семи разделов, заключения, практических рекомендаций, списка цитируемой литературы. Список использованной литературы включает 257 источников, из них 27 – на русском языке.

Раздел 1 (стр. 15-70) посвящён обзору литературы, главным образом вредным последствиям использования химических инсектицидов для окружающей среды и особенностям разработки ДНК-инсектицидов с высоким уровнем экологичности. Приведен обзор трудностей, связанных с разработкой РНК-препаратов для контроля численности чешуекрылых насекомых, и преимущества ДНК-инсектицидов, а также рассмотрены первые эксперименты автора по применению ДНК-инсектицидов на непарном шелкопряде, которые послужили отправной точкой для диссертационной работы. Обобщение и оценка изысканий многих авторов осуществлены на высоком уровне. Выводы и заключения по обсуждаемым вопросам свидетельствуют о хорошем знании диссертантом предмета развития данного направления исследований. Материалы обзора литературы хорошо иллюстрируются рисунками, созданными диссертантом, что помогает глубоко понять представленный материал.

В разделе 2 (стр. 71-90) подробно рассматриваются природные условия опытных участков, материал, объекты и методика исследований. Как положительное следует отметить то, что диссертант профессионально, объективно и полно оценивает условия проведения экспериментов, детально описывает методы изучения влияния антисмыловых олигонуклеотидов на целевых насекомых-вредителей и нецелевые

объекты. По представленным данным схем экспериментов проведённые исследования могут быть довольно подробно воспроизведены. Кроме этого, хорошее впечатление оказывает широкий круг подходов, которые применил автор, некоторые из которых являются его оригинальной разработкой, в частности, обнаружение проникновения oligoRIBO-11-фрагмента и oligoRINGфрагмента методом спектрофотомерии.

В разделе 3 (стр. 91-119) обсуждаются аспекты влияния коротких одноцепочечных фрагментов антиапоптозных генов на биологические показатели безвирусного шелкопряда и других насекомых. Исследованы вопросы, отражающие влияние антисмысловых олигонуклеотидов на насекомых, которые приводят к глубоким и долгосрочным биологическим изменениям в организме насекомого (увеличение смертности, снижение биомассы, уменьшение количества самок в поколении, увеличение содержания кальция и магния в тканях), сопровождающие его до следующей генерации (яйца насекомого) включительно.

В разделе 4 (стр. 120-137) рассмотрено изучение эффекта повышения смертности гусениц непарного шелкопряда, заражённых вирусом ядерного полиэдроза и обработанных коротким антисмысловым фрагментом его антиапоптозного IAP-3-гена. Отображены эксперименты по исследованию повышения смертности гусениц, которых заразили ВЯП НШ в лабораторных условиях и в природе, а также эксперименты по изучению снижения биомассы гусениц, которых заразили ВЯП НШ в лабораторных условиях. Сделан вывод, что на следующий год после обработки бакуловирусными препаратами, на том же участке леса возможно применение oligoRING-фрагмента антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ в качестве ДНК-инсектицида для гусениц, которые получили бакуловирус трансовариально или заразились им в природе горизонтально. И хотя дополнительная обработка ДНК-инсектицидом после применения бакуловирусного препарата не представляется экономически выгодным мероприятием, вместе с тем, оно повышает эффективность применения бакуловируса. При определённых условиях – когда насекомое уже заражено бакуловирусом – предлагаемый подход может существенно понизить уровень затрат на защиту растений от целевого вредителя.

В разделе 5 (стр.138-177) представлены исследования, направленные на обнаружение клеточного ответа на действие oligoRING-фрагмента антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ у безвирусных и заражённых этим вирусом гусениц непарного шелкопряда. Показано, что деградация oligoRING-фрагмента клеточными дезоксирибонуклеазами (ДНКазами) и взаимодействие oligoRING-фрагмента с целевой мРНК антиапоптозного гена являются теми двумя конкурентными процессами, от которых зависит ответ клетки на применённый олигонуклеотид. Полученные результаты говорят о том, что в случае безвирусных насекомых будет преобладать первый процесс, а в случае заражённых ВЯП НШ гусениц – больше шансов для проявления второго. У безвирусных насекомых в отсутствие стресс-факторов

концентрация целевой мРНК антиапоптозного гена будет находиться на низком уровне и вероятность взаимодействия с oligoRINGфрагментом будет мала. Полученные данные представляют научный интерес для фундаментального изучения влияния антисмысловых олигонуклеотидов на клетки насекомых.

В разделе 6 (стр. 178-192) автор исследовал влияние на непарного шелкопряда ДНК-инсектицида на основе антисмылового фрагмента гена, кодирующего 5,8S рибосомальную РНК. На примере фрагмента oligoRIBO-11 показано, что достоверным инсектицидным эффектом могут обладать и очень короткие антисмыловые фрагменты длиной 11 нуклеотидов, что экономически является целесообразным. Показано, что основным специфическим механизмом, обусловливающим гибель клеток насекомого, является снижение уровня биосинтеза белка.

В разделе 7 (стр. 178-192) представлены исследования по изучению избирательности действия ДНК-инсектицидов на основе коротких антисмыловых фрагментов антиапоптозных генов. Среди протестированных фрагментов ДНК (основные – "oligoRING", "oligoRIBO-11", "oligoA", "oligoCpG", "oligoBIR", "oligoHB") только антисмыловые oligoRING-фрагмент и oligoRIBO-11-фрагмент вызывают глубокие целевые процессы в клетках *L. dispar* (апоптоз и нарушения в биосинтезе белка соответственно), которые в конечном итоге приводят к гибели насекомого. Разработанные против *L. dispar* ДНК-инсектициды (oligoRING-фрагмент и oligoRIBO-11-фрагмент), не оказывают существенного негативного влияния на нецелевые организмы.

Работа завершается изложением вполне обоснованного заключения, практических рекомендаций и перспективами дальнейшей разработки темы диссертации (стр. 226-230).

Таким образом, в рассматриваемой диссертационной работе имеются многочисленные оригинальные сведения и разработки, характеризующие новое постгеномное направление в защите растений, основанное на применении немодифицированных (природных) антисмыловых олигонуклеотидов как регуляторов численности насекомых-вредителей с высоким уровнем экологичности. Все они имеют исключительную ценность для науки и практики в области экологии и защиты растений.

Вместе с тем, в диссертации можно заметить некоторые недоработки, упущения и сделать замечания.

1. Слишком незначительным на наш взгляд, выглядит количество источников на русском языке, в общей сложности 27 источников. Несмотря на то, что в русскоязычных странах постгеномный подход в защите растений развивается не столь заметно, чем в англоязычных, возможным было упоминание некоторых обзорных статей на русском языке, посвящённой данной тематике, а также статей и книг на русском языке, которые можно считать предпосылками и предтечей данного направления исследований.

2. В работе можно заметить неисправленные грамматические погрешности и неточности, неудачные выражения и предложения (стр.: 2, 7, 30, 71, 88, 159, 198 и др.).

3. На стр.155-166 представлен анализ микросрезов гусениц непарного шелкопряда, контактно обработанных ДНК-олигонуклеотидами. На наш взгляд, данный фрагмент можно было не представлять в диссертации, так как он не является ключевым и скорее состоит из большого количества гипотез, которые нужно проверить в отдельных экспериментах. Возможно, что такой раздел был бы более уместен в случае фундаментальных энтомологических исследований.

4. В определённой мере непонятно каким именно образом в будущем автор планирует создать ДНК-инсектицид, который сможет конкурировать с современными химическими инсектицидами, под действием которых смертность насекомых-вредителей достигает 85-100%? Планируется ли добавление в формулу препарата веществ-переносчиков, увеличение дозы активного, или, возможно, есть смысл поиск более чувствительных к ДНК-инсектицидам группы насекомых-вредителей не из отряда чешуекрылых?

5. Как автор может объяснить довольно скромный интерес западных учёных к разработке ДНК-инсектицидов? Известно, что практически все исследования ими ведутся в направлении создания РНК-препаратов, которые, по мнению автора, значительно уступают ДНК-инсектицидам, в частности, в доступности. Не является ли основной причиной то, что при использовании ДНК-инсектицидов в клетках не наблюдается системного ответа и амплификации инсектицидного сигнала, как это происходит при системной РНК-интерференции?

6. На стр. 211 автор говорит о том, что в ходе исследований было обнаружена ДНК длиной 400-500 п.н., в норме, образующейся на поверхности листьев таких растений, как айлант высочайший *Ailanthus altissima* Mill. и осина обыкновенная *Populus tremula* L. Таким образом, заключает автор, возможно, что некоторые растения могут использовать свою частично деградированную геномную ДНК в качестве природных ДНК-инсектицидов. На наш взгляд, данное явление достаточно интересное и требовало проведения прямых экспериментов для подтверждения своей состоятельности.

Однако, отмеченные недоработки, упущения, погрешности не снижают ценности диссертационной работы, не влияют на основные теоретические и практические положения.

Научные разработки автора диссертации, экспериментальные данные по испытанию ДНК-инсектицидов в природе и лабораторных условиях, а также комплексная оценка их влияния на нецелевые организмы будут полезны специалистам из области защиты растений и экологам. Исследованные автором глубокие изменения, которые происходят в тканях насекомых-вредителей в ответ на применение ДНК-инсектицидов, будут полезны и интересны энтомологам и молекулярным биологам. Практические рекомендации по применению ДНК-инсектицидов для контроля численности непарного шелкопряда будут полезны лесозащитным службам. Результаты исследований по разработке ДНК-инсектицидов на основе немодифицированных антисмыковых олигонуклеотидов должны

быть включены в учебные пособия для студентов биологических и сельскохозяйственных специальностей ВУЗов, а также могут представлять интерес для магистров, аспирантов, научных сотрудников.

Заключение

Рецензируемая диссертация является вполне завершенным научным трудом, выполненным автором самостоятельно на высоком методическом уровне, имеющем высокую степень актуальности, научной новизны, практической значимости, востребованности, достоверности и обоснованности полученных результатов и выводов. Работа выполнена на обширном экспериментальном материале, большом количестве оригинальных данных, примеров и расчетов. Она написана доходчиво, грамотно и аккуратно, красиво оформлена. По каждой главе и работе в целом сделаны исчерпывающие и четкие заключения. Автореферат и опубликованные труды полностью соответствуют основному содержанию диссертации.

Диссертационная работа «Экологические основы контроля численности листогрызущих насекомых с применением ДНК-инсектицидов» полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (пп. 9-14), утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013, № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а её автор Оберемок Владимир Владимирович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.08 - Экология (биологические науки) и 06.01.07 - Защита растений.

Отзыв на диссертационную работу и автореферат Оберемка Владимира Владимировича подготовлен и.о. зав. лаборатории интегрированной защиты растений, доктором биологических наук по специальности «защита растений» Есипенко Леонидом Павловичем. Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании Учёного совета (протокол № 5 от «03» октября 2019 г.).

Ведущий научный сотрудник,
и.о. зав. лаборатории интегрированной
защиты растений ФГБНУ ВНИИБЗР,
доктор биологических наук, доцент
06.01.07 – защита растений

Ученый секретарь ФГБНУ ВНИИБЗР,
кандидат биологических наук



Есипенко
Леонид Павлович

Есауленко
Елена Александровна

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно исследовательский институт биологической защиты растений» (ФГБНУ ВНИИБЗР): 350039, Россия, г. Краснодар, п/о 39, ФГБНУ ВНИИБЗР

E-mail: vniibzr@mail.kuban.ru, телефон 8 (861) 228-17-76