

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Оберемка Владимира Владимировича «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

Актуальность исследований.

Автором четко обоснована актуальность исследований. Расширение применения средств биоконтроля вредителей выращиваемых культур представляет важный аспект развивающейся в настоящее время экологической системы сельскохозяйственного производства. Экологическая система предусматривает максимально возможное сохранение всех природных компонентов агроэкосистемы. В этой связи, 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.

Новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации Диссертационное исследование В.В.Оберемка содержит обширную и ценную научную информацию по одной из важнейших проблем экологизации сельскохозяйственного производства. Впервые продемонстрирована эффективность контактных ДНК-инсектицидов в регуляции численности непарного шелкопряда на основе коротких антисмысловых 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. На примере фрагмента oligoRIBO-11 показано, что достоверным инсектицидным эффектом могут обладать и очень короткие антисмыловые фрагменты длиной 11 нуклеотидов. Показано, что контактная обработка листьев мяты перечной антисмыловым ДНК-фрагментом oligoMER-11, комплементарного к мРНК ментонредуктазы, приводит к снижению содержание ментола и увеличению содержания ментона.

Впервые обнаружен эффект повышения смертности непарного шелкопряда и шелкопряда-моноашенки, 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. Таким образом, в работе был обобщен опыт ведущих научных разработок и представлены оригинальные результаты исследований. Выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, характеризуются научной новизной и имеют высокую степень обоснованности. В ней представлен добротный, квалифицированный анализ публикаций по проблеме, причем не только отечественных, но и зарубежных авторов. Методика постановки и выбор условий проведения исследований корректны, научно обоснованы, эксперименты характеризуются достаточными аналитическими повторностями, позволившими автору сделать хорошо обоснованные выводы.

Применение стандартных, апробированных методов исследования, использование при обработке и анализе материалов методов математической статистики, убеждают в достоверности полученных результатов исследований.

Значимость для науки и производства Материалы исследований могут быть использованы для оздоровления сельскохозяйственного производства, а также для производства экологически чистой сельскохозяйственной продукции. В результате открываются широчайшие перспективы нового способа воздействия на численность листогрызущих насекомых. Показана эффективность контактного применения коротких антисмысловых ДНК-олигонуклеотидов в качестве агентов повышения смертности целевых насекомых-вредителей путём их негативного влияния на клеточные механизмы клеток насекомых. Показана высокая экологичность ДНК-инсектицидов на ряде нецелевых организмов. Результаты диссертационного исследования используются в курсах лекций и на практических занятиях по экотоксикологии, экологической генетике и биохимии, физиологии и биохимии пестицидов геномике и протеомике, технологиях производства овощной продукции в Таврической академии и Академии биоресурсов и природопользования в ФГАОУ ВО "Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского". Таким образом, работа В.В. Оберемка имеет большое практическое значение для науки и сельского хозяйства.

Личный вклад автора. Автору принадлежит разработка и развитие идеи создания ДНК-инсектицидов, планирование и проведение комплексных полевых и лабораторных исследований, анализ научной литературы, сбор и статистическая обработка материала, его теоретическая интерпретация, обобщение результатов проведённых исследований, разработка и внедрение методов эколого-биологической оценки действия антисмысловых олигонуклеотидов на целевые и нецелевые организмы, разработка

практических рекомендаций. Работа построена по достаточно четкому плану. Диссертация состоит из введения, 7 разделов, заключения, практических рекомендаций, списка литературы; изложена на 259 страницах, проиллюстрирована 83 рисунками, 18 таблицами, список литературы включает 257 источников, в том числе 230 иностранных.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 18-316-00063\18 (раздел 4).

Анализ диссертации.

В введении убедительно обоснована актуальность и цель проведенного исследования, перечислены задачи, решавшиеся в ходе работы, сформулированы защищаемые положения.

В Разделе I «Биология инсектицидов» диссертации дан глубокий анализ литературы по проблеме. Обзор посвящён проблемам применения современных инсектицидов, а также актуальности и перспективам создания ДНК-инсектицидов с высоким уровнем экологичности. Анализ литературных источников свидетельствует о том, что автор с самого начала строил свои исследования с учетом степени изученности проблемы с вычленением нерешенных и перспективных вопросов, то есть на базе обширной отечественной и зарубежной информации.

Раздел II «Объекты и методы проведения исследований» посвящен характеристике объектов и методов исследования. Дано описание непарного шелкопряда описано выращивание насекомых в лабораторных условиях. Подробно описаны методики выращивания растений, методики экспериментов по выделению, амплификации и анализу нуклеиновых кислот. Были применены параметрический тест Стьюдента и непараметрические хи-квадрат критерий Пирсона с поправкой Йетса. Статистические расчёты были проведены на базе компьютерных программ STATISTICA 7.0 и Excel 2010. Эксперименты имели от 3 до 9 повторностей.

В целом уровень методического обеспечения исследований позволил сделать обоснованный анализ полученных материалов и построить достоверные выводы.

Результаты и обсуждение. В разделе III «Влияние коротких одноцепочечных фрагментов антиапоптозных генов на биологические показатели безвирусного шелкопряда и других насекомых» в основном, как по содержанию, так и по объему состоящем из 4 пунктов приведены результаты исследований и дана их подробная интерпретация. Положительным моментом является то, что при обсуждении полученных результатов автор активно и к месту привлекает литературный материал. Материал хорошо иллюстрирован, таблицы, рисунки и графики, помогают лучше разобраться в полученных результатах.

В качестве мишени для экспериментов с ДНК-инсектицидами была выбрана 5,8S рРНК, так как она имеет успешную историю применения её фрагментов в качестве антисмысловых олигонуклеотидов. Исследования по ингибированию синтеза белка специфическими антисмысловыми олигонуклеотидами к 5,8S рРНК показывают, что эта РНК играет важную роль в функционировании эукариотической рибосомы.

Обнаруженная ДНК-инсектицидная активность может внести свой вклад в разработку фундаментальных основ биологического действия антисмыловых олигонуклеотидов на насекомых и стать решением ещё одной актуальной проблемы сельского и лесного хозяйства, связанной с повышением скорости действия бакуловирусных препаратов.

В пункте 1 «Повышение смертности насекомого» Отмечено повышение смертности и снижение биомассы, уменьшение количества самок в обработанном ДНК-инсектицидом поколении, переход инсектицидного эффекта oligoRING-фрагмента в следующее поколение – повышение содержания кальция и магния в тканях яиц шелкопряда.

Инсектицидный эффект oligoRING-фрагмента наблюдался при контактном попадании олигонуклеотида в пределах от 3 до 30 пмоль на гусеницу I-II возраста.

Помимо уменьшения выживаемости насекомого-вредителя, также было обнаружено достоверное снижение в накоплении им биомассы под действием oligoRING-фрагмента

Одним из самых значимых результатов данной работы стало обнаружение инсектицидного действия РНКаза Н-зависимого антисмыслового oligoRING-олигонуклеотида из консервативного RING-домена антиапоптозного IAP-3-гена вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) на его хозяина – непарного шелкопряда (НШ).

В пункте 2 «Снижение биомассы насекомого» описывается изучение эффекта повышения смертности гусениц непарного шелкопряда, заражённых вирусом ядерного полиэдроза и обработанных коротким антисмысловым фрагментом его антиапоптозного IAP-3-гена.

Отмечалось повышение смертности гусениц, которых заразили ВЯП НШ в лаборатории, снижение биомассы гусениц, которых заразили ВЯП НШ в лаборатории, повышение смертности гусениц, которые были заражены ВЯП НШ в природе.

В пункте 3 «Уменьшение количества самок в обработанном oligoRING-фрагментом поколении» выявлено, что oligoRING-фрагмент не только обладает инсектицидным эффектом на насекомое, но и оставляет в потомстве на 25% меньше морфологических самок, чем в контроле, что снижает риски возникновения вспышки численности насекомого на следующий год в месте, где проведена обработка oligoRING-инсектицидом.

В пункте 4 «Переход инсектицидного эффекта oligoRING-фрагмента в следующее поколение – повышение содержания кальция и магния в тканях яиц шелкопряда и снижение скорости развития эмбрионов» Выявлено, что

однократная обработка oligoRING-фрагментом насекомого на стадии гусеницы младшего возраста приводит 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), которые сопровождают его до следующей генерации (яйца насекомого) включительно.

В Разделе 4 «Изучение эффекта повышения смертности гусениц непарного шелкопряда, зараженных вирусом ядерного полиэдроза и обработанных коротким антисмысловым фрагментом фрагментом его антиапоптозного IAP-3-гена» обсуждается проблема того, что бакуловирусы в ходе эволюции "научились" противостоять преждевременной гибели зараженных ими клеток насекомых. Они обладают арсеналом антиапоптозных белков, которые либо сами противостоят клеточным апоптозным белкам, либо способны изменить активность клеточных генов, что приводит к сдвигу баланса сил в сторону клеточных антиапоптозных белков. Это даёт время размножаться вирусу в клетках насекомого.

В пункте 1 «Повышение смертности гусениц, которых заразили ВЯП НШ в лабораторных условиях» обнаружено, что oligoRING-фрагмент на фоне бакуловирусной инфекции достоверно повышал смертность непарного шелкопряда за отведённый промежуток времени по сравнению с контролем.

В пункте 2 «Снижение биомассы гусениц, которых заразили ВЯП НШ в лабораторных условиях» был получен инсектицидный эффект при использовании антисмылового oligoRING-фрагмента антиапоптозного IAP-2-гена ВЯП НШ (5'-TGAACTCGACGCTTGTCC-3') кишечным путём на гусеницах непарного шелкопряда, которые в течение суток

получили дозу в 10^4 вирусных полиэдров и через 4 суток со свежими листьями дуба получили 75 пмоль олигонуклеотида

В пункте 3 «Повышение смертности гусениц, которые были заражены ВЯП НШ в природе» Результаты показывают, что антисмыловой oligoRING-фрагмент повышает смертность заражённых в природе ВЯП НШ гусениц непарного шелкопряда достаточно быстро, через 5 суток, увеличивая этим эффективность действия бакуловирусных препаратов.

В Разделе 5 «Обнаружение специфического клеточного ответа на действие OLIGORING-фрагмента антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ у безвирусных и зараженных этим вирусом гусениц непарного шелкопряда» в пункте 1 «Безвирусные гусеницы непарного шелкопряда» решалась задача обнаружения целевого антиапоптозного гена (IAP-Z) непарного шелкопряда, на экспрессию которого oligoRING-фрагмент будет действовать по механизму РНКаза Н-зависимых антисмыловых олигонуклеотидов. Рассматривается обнаружение антиапоптозного IAP-Z-гена непарного шелкопряда, обладающего высокой степенью гомологичности антиапоптозному IAP-3-гену ВЯП НШ и анализ изменения его экспрессии у безвирусных насекомых.

В пункте 2 «Заражённые ВЯП НШ гусеницы непарного шелкопряда» говорится о том, что короткий антисмыловой oligoRING-фрагмент повышает смертность как безвирусных, так и заражённых вирусом гусениц непарного шелкопряда, запуская выраженные апоптотические процессы в клетках вредителя.

В Разделе 6 «ДНК-инсектицид на основе антисмылового фрагмента гена, кодирующего 5,8S рибосомальную РНК» в качестве мишени для экспериментов с ДНК-инсектицидами была выбрана 5,8S pРНК, так как она имеет успешную историю применения её фрагментов в качестве антисмыловых олигонуклеотидов.

В пункте 1 «Антисмысловой oligoRIBO-11-фрагмент проникает в клетки гусениц непарного шелкопряда» на примере oligoRIBO-11-фрагмента было показано, что одноцепочечные ДНК-фрагменты способны проникать через хитиновый покров в клетки насекомого.

В пункте 2 Антисмыловой oligoRIBO-11-фрагмент вызывает смертность гусениц непарного шелкопряда, выращенных в лаборатории и устойчивых к oligoRING-инсектициду.

В пункте 3 «OligoRIBO-11-фрагмент снижает концентрацию 5,8S рРНК в клетках гусениц непарного шелкопряда».

В пункте 4 приведены свидетельства снижения уровня биосинтеза белка в тканях гусениц непарного шелкопряда, обработанных oligoRIBO-11-фрагментом

В Разделе 7 «Избирательность действия ДНК-инсектицидов на основе коротких антисмысловых фрагментов антиапоптозных генов» делается вывод о том, что для контроля каждого насекомого-вредителя может быть создан свой "oligoRING-фрагмент", который будет безопасен для нецелевых организмов и человека. В этом лежит основа природоподобности подхода ДНК-инсектицидов и их высокого уровня экологичности.

Представлены результаты контактной обработки oligoBIR-фрагментом и oligoRING-фрагментом IAP-3-гена ВЯП НШ нецелевых насекомых, нецелевых растений и влияние на стволовые клетки быка домашнего. Указывается на то, что использование для контроля численности листогрызущих насекомых коротких антисмысловых последовательностей антиапоптозных и других функционально важных генов позволит уменьшить вероятность негативного воздействия на нецелевые организмы и снизить экологические риски. Для контроля каждого насекомого-вредителя может быть создан свой "oligoRING-фрагмент", который будет безопасен для нецелевых организмов и

человека. В этом лежит основа природоподобности подхода ДНК-инсектицидов и их высокого уровня экологичности.

В заключении автором с помощью методов экологии, генетики, биохимии, гистологии, органической и аналитической химии был комплексно исследованы биологические эффекты действия антисмыловых олигонуклеотидов в качестве ДНК-инсектицидов с высоким уровнем экологичности на целевые и нецелевые организмы.

На основе достаточно глубокого анализа и обобщения экспериментальных данных автором сформулированы выводы, исходящие из задач исследований, а также практические рекомендации. Все они вытекают из материалов диссертации, построены лаконично, обоснованно, адекватно изложенному материалу и задачам, поставленным перед исследователем. Содержание автореферата отражает основные положения и выводы диссертации.

В диссертации имеются следующие недостатки:

1. Помимо проведенных автором экспериментальных наблюдений за влиянием контактных ДНК-инсектицидов необходимо проведение экспериментов по сравнению их воздействия с воздействием широко применяемых современных инсектицидов.
2. Автором не указано, подвержены ли исследуемые препараты термическому воздействию, поскольку их применение подразумевает использование в весенне-летний период.
3. Автором не приведены сроки хранения предлагаемых препаратов, что может так же отразиться на рентабельности их применения.
4. К сожалению, не достаточно сформулирована в выводах экономическая эффективность работы, хотя в самой диссертационной работе эффективность отмечена.
5. Работа бы выиграла, если бы были проведены производственные опыты в различных климатических зонах.

6. Автореферат имеет некоторые различия с диссертационной работой, так в работе приведены названия разделов, а в автореферате они отсутствуют, некоторые разделы и подпункты вероятно были объединены автором в результате чего нумерация разделов автореферата не совпадают с нумерацией разделов диссертации.

7. В диссертационной работе Выводы по диссертации представлены в Заключении, далее даны Практические рекомендации, в Автореферате Практические рекомендации отсутствуют.

8. По тексту замечены незначительные опечатки, стилистические погрешности, повторы информации. Встречаются орфографические ошибки.

Перечисленные замечания в основном носят непринципиальный характер и не снижают общую положительную оценку.

Основные результаты исследований автора апробированы на многочисленных научных конференциях международного и всероссийского уровня, опубликованы в 50 научных работах, в том числе 2 главы книг, 4 патента и 21 статья в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, из них 17 входящих в международную базу данных Scopus. Автореферат отражает основные положения диссертации. Новые научные результаты, полученные диссидентом, представляют непосредственный интерес для науки и практики. Материалы диссертации могут быть использованы в научно-педагогическом процессе ВУЗов биологического и сельскохозяйственного направлений. В целом, диссертация Оберемка В.В. выполнена на высоком научно-методическом уровне, достаточно грамотно изложена, ее отличает тщательность и многоплановость исследований, обширный объем материала и большой практический выход.

Заключение

Диссертационная работа Оберемка Владимира Владимировича на тему «Экологические основы контроля численности листогрызущих насекомых с применением ДНК-инсектицидов», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой и соответствует паспортам специальностей 03.02.08 – Экология (биологические науки) и 06.01.07 – защита растений. Диссертация по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов, по объему и уровню проведенных исследований соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ, предъявляемым к диссертациям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013г. №842, на соискание ученой степени, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени доктора биологических наук.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
доцент кафедры зоологии

Академии биологии и биотехнологии
им. Д.И. Ивановского

Федерального государственного автономного

образовательного учреждения высшего образования
«Южный федеральный университет»

Елена Ильинична

E.Simonovich Симонович



Подпись Симонович Елены Ильиничны заверяю:

ЗАВЕРЯЮ:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет» (ФГАОУ ВО ЮФУ), Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, кафедра зоологии
Почтовый адрес: 344090, ЮФО, Ростовская область, г. Ростов-на-Дону, пр. Ставки 194/1
Телефон: +7 (863)218-40-00 доб 14101. e-mail: biolog@sfedu.ru, simonovichei@sfedu.ru