

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Оберемока Владимира Владимировича
«ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОНТРОЛЯ ЧИСЛЕННОСТИ
ЛИСТОГРЫЗУЩИХ НАСЕКОМЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ ДНК-
ИНСЕКТИЦИДОВ», представленную для защиты в диссертационный совет
Д 900.011.01 на базе ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени
Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» по
специальности 03.02.08 – экология и 06.01.07 – защита растений на
соискание ученой степени доктора биологических наук.

Диссертационная работа В.В. Оберемока посвящена изучению воздействия коротких антисмысловых фрагментов генов, регулирующих апоптоз и синтез рРНК, на различных насекомых. Установлено, что некоторые фрагменты ДНК могут подавлять жизнедеятельность насекомых. Выполнена оценка избирательности действия ДНК фрагментов с инсектицидной активностью на различные организмы. Кроме того, в работе проведен комплексный анализ популяционных и физиологических показателей целевых насекомых-вредителей (непарный шелкопряд, металлоидка серая, комар обыкновенный), а также нецелевых организмов на воздействие коротких фрагментов ДНК. Актуальность проблематики диссертации сомнений не вызывает. Ее экспериментальная часть, составляющая основу работы, выполнена с привлечением современных методов и использованием широкого спектра видов насекомых.

Данная работа закладывает предпосылки для создания и совершенствования новой группы инсектицидов с высоким уровнем специфичности на основе коротких антисмысловых ДНК фрагментов. Следует отметить, что понимание особенностей строения, способа действия и рисков применения изучаемых фрагментов ДНК является крайне важным и

значимым аспектом для создания новых эффективных и избирательных инсектицидов. Можно заключить, что работа В.В. Оберемока направлена на создание ДНК-инсектицидов, которые смогут объединить наилучшие качества современных препаратов, и могут стать востребованными препаратами на рынке инсектицидов.

В рецензируемой работе получены новые, уникальные результаты. В частности, впервые продемонстрирована эффективность контактных ДНК-инсектицидов на основе коротких антисмысловых фрагментов генов, регулирующих апоптоз (IAP) и гена, кодирующего 5,8S рРНК в регуляции численности непарного шелкопряда. Следует отметить оригинальный подход по использованию фрагментов IAP-3 гена вируса ядерного полиэдроза. Впервые обнаружен эффект повышения смертности непарного шелкопряда и шелкопряда-монашенки, заражённых вирусом ядерного полиэдроза, и обработанных коротким антисмысловым фрагментом антиапоптозного гена (IAP-3). Показано, что контактная обработка листьев мяты перечной антисмысловым ДНК-фрагментом, комплементарного к мРНК ментонредуктазы, приводит к снижению содержания ментола и увеличению содержания ментона. Полученные результаты о влиянии антисмысловых олигонуклеотидов на соотношение полов непарного шелкопряда и дрозофилы. Показана избирательность действия ДНК-инсектицидов при их тестировании на нецелевых организмах.

Работа состоит из введения, 7 глав, заключения и списка литературы. Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации. Сама диссертация и автореферат хорошо иллюстрированы. Результаты исследований опубликованы в рецензируемых научных журналах из списков Web of science и Scopus, а также были представлены на конференциях.

В литературном обзоре подробно рассмотрены основные инсектициды и их механизм действия на насекомых. Однако, при описании действия бактерий *Bacillus thuringiensis* представлен только один механизм действия Cry токсинов по принципу образования поры в мембране клеток эпителия

кишечника насекомых. Следует отметить, что существует еще один механизм действия по принципу сигнального каскада. Также в литературном обзоре не упомянуты инсектициды на основе энтомопатогенных грибов и метаболитов микроорганизмов. Следует отметить, что данные препараты, например *Entomophaga maimaiga*, весьма эффективны против непарного шелкопряда. В литературном обзоре, автор уделит большое внимание анализу современных направлений создания препаратов на основе ДНК и РНК, а также биотехнологических решений по доставке нуклеиновых кислот с инсектицидной активностью к насекомым вредителям (раздел 1.7). Однако, автор упустил из виду ряд исследований и подходов, которые, в данный момент, решили проблемы применения и доставки РНК фрагментов, а именно синтез РНК симбионтными микроорганизмами, использование коротких фрагментов РНК (siRNA, 20 п.н.), наличие компаний, специализирующихся на коммерческом синтезе РНК и значительном снижении себестоимости продукта. Таким образом, ряд выводов автора, о недостатках продуктов на основе РНК выглядят несостоятельными. В разделе 1.6, диссертант поднимает важные вопросы механизма действия ДНК/РНК фрагментов и путей их проникновения в организм насекомых. Следовало бы привести более детальную схему действия антисмысловых олигонуклеотидов (рисунок 1.13). На рисунке 1.13 мРНК изображена с включённым в состав азотистым основанием – тиминном, отсутствуют два класса антисмысловых олигонуклеотидов и возможные источники РНКаз в клетке.

В главе, посвященной описанию объектов и методов, диссертант четко обосновывает выбор модельных систем и методик проведения многочисленных экспериментов. Хочется отметить оригинальный подход, который, собственно, и позволил получить столь значимые результаты. Это контактная обработка насекомых фрагментами ДНК, которые обеспечивают «сайленсинг» генов, связанных с апоптозом и синтезом рРНК по принципу РНК интерференции. Используются самые современные методики, включая

ПЦР в реальном времени, секвенирование нового поколения (Illumina), подавление экспрессии гена-мишени, фотометрия, хроматография, МАЛДИ и др. Методы соответствуют мировому уровню и не оставляют сомнений в валидности полученных при их использовании материалов. В качестве замечания, необходимо отметить, что диссертант очень скудно описывает гены различных насекомых, отобранные как «контрольные» и для «блокирования», а также процесс дизайна олигонуклеотидов (Раздел 2.4). Это крайне важная методическая часть диссертации и недостаток информации по данному разделу является досадным упущением. Для статистической обработки полученных данных диссертант использовал тест Стьюдента и хи-квадрат. Однако, не везде обозначены используемые методы, что несколько осложняет сопоставление корректности применяемого метода к полученным данным (например: рис 3.3, таб 3.1, рис 3.15 и пр.). В разделе 2.23 подробная информация о том, какие данные каким методом обрабатывались, а также точные выборки для экспериментов отсутствуют.

Основная, результативная часть работы изложена в пяти главах, в которых последовательно рассматриваются действие различных ДНК фрагментов на целевые и нецелевые организмы, проникновение ДНК фрагментов в организм насекомых, использование ДНК фрагментов совместно с вирусом, избирательность действия ДНК фрагментов. Полученные результаты хорошо иллюстрированы и подробно обсуждаются с привлечением современной литературы. Результаты, полученные диссертантом, свидетельствуют, что проведено объемное и комплексное исследование. Отмечу лишь основное, на мой взгляд. Однократное контактное применение антисмыслового ДНК фрагмента антиапоптозного гена в концентрации 3-30 пмоль на личинку непарного шелкопряда младших возрастов приводит к повышению смертности, на фоне глубоких изменений в организме насекомого, таких, как снижение массы, увеличение содержания кальция и магния в тканях, конденсация и фрагментация ядерного материала. Антисмысловой ДНК фрагмент другого гена, кодирующего 5,8S рРНК, в

концентрации 6 пмоль на личинку, повышает смертность гусениц младших возрастов непарного шелкопряда. Зафиксирован инсектицидный эффект при использовании коротких одноцепочечных фрагментов антиапоптозного IAP-3-гена на гусеницах *Trichoplusia ni* и антиапоптозного IAP-1-гена *Culex pipiens*. Контактная обработка личинок *L. dispar* антисмысловым ДНК фрагментом IAP-Z-гена и личинок *Drosophila melanogaster* антисмысловым ДНК фрагментом DIAP-2-гена приводит к более высокой частоте формирования морфологических самцов. ДНК фрагмент вызывает увеличение смертности гусениц *Lymantria monacha* в комбинации с вирусом. На безвирусных и заражённых вирусом гусеницах непарного шелкопряда с помощью анализа микросрезов тканей, детекции апоптотической "ДНК-лестницы" и оценки концентрации целевых РНК хозяина показано, что основными специфическими механизмами, обуславливающими гибель клеток насекомого, является апоптоз в случае ДНК фрагмента антиапоптозного гена и снижение уровня биосинтеза белка в случае антисмыслового ДНК фрагмента рРНК. Среди протестированных фрагментов ДНК только антисмысловые ДНК фрагменты вызывают глубокие целевые процессы в клетках насекомых, которые в конечном итоге приводят к их гибели. Разработанные против *L. dispar* ДНК-инсектициды, не вызывают гибели нецелевых насекомых.

В заключительной части диссертации (глава "Заключение") В.В. Оберемока перечислены основные результаты, полученные в работе.

Несомненно, все перечисленные замечания ни в коей мере не снижают достоинств выполненного исследования, представляющего крупный вклад в изучение особенностей воздействия коротких антисмысловых фрагментов ДНК на насекомых.

Заключение

Подводя итог, следует заключить, что диссертация В.В. Оберемока представляет собой законченное оригинальное исследование с высокой

степенью новизны. Выносимые на защиту положения имеют хорошую доказательную базу. Сделанные заключения обоснованы и логически вытекают из приведенных в диссертации материалов, а автореферат соответствует ее содержанию. Считаю, что В.В. Оберемок заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 – экология и 06.01.07 – защита растений, поскольку работа соответствует требованиям "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденных постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемых диссертациям.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук, Заведующий
Лабораторией Биологической Защиты
Растений и Биотехнологии, Профессор
Кафедры Защиты растений Федерального
государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Новосибирский
государственный аграрный университет»



Иван Михайлович
Дубовский

Подпись Дубовского Ивана Михайловича заверяю

Начальник отдела кадров

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Новосибирский государственный аграрный университет»
Почтовый адрес: 630039, Добролюбова 160, Новосибирск, Россия
Тел.: (383) 267-38-11, факс: 264-26-00 E-mail: rector@nsau.edu.ru

Подпись Дубовского
Ивана Михайловича
удостоверено
Зам. начальника
отдела кадров



Новосибирск 11.11.14