

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Гальчинского Никиты Витальевича

«Биологическое обоснование разработки и применения инновационных олигонуклеотидных инсектицидов для борьбы с насекомыми-вредителями из подотряда грудохоботных (Hemiptera: Sternorrhyncha)», представленную на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.3 – Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений (сельскохозяйственные науки).

Диссертация Гальчинского Н.В. посвящена разработке и обоснованию возможности использования одноцепочечных, не модифицированных, 11-мерных ДНК-олигонуклеотидов для борьбы с такими насекомыми-вредителями как щитовки, ложнощитовки, червецы и псиллиды, входящие в подотряд грудохоботных отряда полужесткокрылых (Hemiptera). Поскольку изученные представители группы являются опасными сосущими вредителями, проведенное исследование является актуальным и представляет существенный интерес для сельскохозяйственной практики. Предложенный в диссертации новый подход для создания и применения экологически безопасных содержащих ДНК биоинсектицидов нового поколения, содержащих ДНК, несомненно, представляет большой интерес и для науки в целом.

При проведении 8-летних исследований в рамках диссертационной работы автор использовал разнообразные подходы, включая классические методы обработки растений с помощью мелкокапельного распыления, измерения массы обработанных насекомых, анализа смертности вредителей и статистическую обработку результатов, а также современные молекулярные методы твердофазного фосфорамидитного синтеза ДНК-олигонуклеотидов, их масс-спектрометрического анализа, ДНК-секвенирования, и количественного анализа содержания РНК-транскриптов в пробах насекомых с помощью обратной транскрипции и количественного ПЦР в реальном времени.

Диссертация представлена на 179 страницах и состоит из Введения, 5 Разделов, Заключения, Практических рекомендаций, описания Перспектив дальнейшей разработки темы исследования, Списка условных сокращений и обозначений, Списка литературы и 9 Приложений, обозначенных буквами А-З. Работа включает 9 таблиц и 25 рисунков. Список литературы содержит 323 источника, из них 305 на английском языке.

Во введении аргументированно обоснованы актуальность исследуемой проблемы, поставленные в работе цель и задачи, показаны научная новизна и значимость работы. Раздел 1 диссертации представляет собой достаточно подробный анализ литературных данных, аргументированно перечисляющий и подчеркивающий преимущества использования в защите растений инсектицидных препаратов на основе нуклеиновых кислот, а также сильные стороны

контактного пути их доставки в организм вредителя. Значительное внимание при этом уделяется не только одноцепочечным ДНК-олигонуклеотидам, но и возможности применения препаратов, содержащих двуцепочечную РНК (дцРНК) и действующих на основе РНК-интерференции (РНКи). Независимо от результатов, полученных при выполнении самой диссертационной работы, столь подробный анализ литературы до публикаций 2024 года включительно, самостоятельно представляет значительный интерес для специалистов, интересующихся новыми, современными подходами в области защиты растений.

По сравнению с обзором литературы, описанные в Разделе 2 условия, объекты и методы исследований, представлены не столь подробно. Описание особенностей поддержания культур 6 изученных видов вредителей ограничивается лишь фразой «насекомые находились в квазиприродных условиях» (стр. 47) с указанием на листьях какого растения «находился» тот или иной вид. Это позволяет догадаться, что обработке и последующему анализу подвергались насекомые, обнаруженные на листьях насаждений, непосредственно в ботаническом саду. В этом случае следовало бы более подробно описать методику учета живых и мертвых особей в дополнение к загадочной фразе «Смертность насекомых регистрировали и рассчитывали в зависимости от ситуации» (стр. 53). Вместе с тем, фраза «личинки первого и второго возрастов обрабатывались в независимых экспериментах» (так же стр. 53) подразумевает проведение каких-то более сложных экспериментов с насекомыми в лабораторных условиях.

Следует отметить, что для каждого из 7 изученных в диссертации олигонуклеотидов употребляется глагол «разработан» или «диссертантом самостоятельно были разработаны нуклеотидные последовательности» (стр. 49). Хорошо бы перечислить использование каких подходов подразумевает такая разработка и по каким критериям нуклеотидные последовательности отбирались кроме одинаковой длины в 11 нуклеотидов.

Интересно, что метод измерения массы насекомых описан в подразделе 2.6, но в таблицах и рисунках, демонстрирующих результаты исследований, эти данные не представлены.

Основная часть полученных экспериментальных результатов описана в Разделе 3 и представлена в четырех таблицах и на восьми рисунках этого раздела. Уже первые результаты анализа олигонуклеотидного инсектицида КОККУС-11 против личинок мягкой ложнощитовки в концентрации 1 мг на квадратный метр листьев показали удивительную эффективность и очень высокий уровень смертности вредителя – 53.5 % уже на вторые сутки и более 95% на 12-е сутки. В случае применения ДНК-олигонуклеотида ЯВОЛ-11 в той же концентрации против личинок японской восковой ложнощитовки уровень смертности составил 73 и 83 %, соответственно на 7 и 10 сутки. Для личинок австралийского желобчатого червеца, обработанного препаратом АВЖЕЧ-11 смертность в те же сроки составила 45 и 70.5 %. Обработка британской щитовки ДНК-олигонуклеотидом БРИТ-11 показала 82.4 и 85.1 %

смертности на 10-е и 14-е сутки эксперимента. Наиболее высокие показатели смертности вредителей были достигнуты на 14 сутки после обработки смешанной популяции личинок лавровой и британской щитовок олигонуклеотидом ЛАУРИ-11 (98.2 %) и лавровой листоблошки препаратом ЛАУРА-11 и смесью ЛАУРА-11 и АЛАКРИС-11 (97.2 и 98.7 % соответственно).

Не менее интересные результаты были получены и при анализе содержания транскриптов 28S рРНК в обработанных насекомых. В экспериментах с мягкой ложнощитовкой и олигонуклеотидом КОККУС уровень содержания 28S рРНК возрастал в 6 раз через сутки после обработки. Поскольку содержание этой мажорной рРНК в клетке составляет 55%, достаточно сложно представить себе увеличение содержания в клетке общей РНК более чем в 3 раза в течение суток, хотя к 6 дню после обработки эти значения возвращались к нормальным значениям. В других экспериментах было показано, что содержание 28S рРНК в обработанных насекомых может также снижаться в 6 раз (Рис. 14, обработанный АВЖЕЧ-11 австралийский желобчатый червец, 7-е сутки, праймеры Авжеч28S), в 250 раз (Таблица б, обработанная ЛАУРА-11 лавровая листоблошка, 10-е сутки, праймеры Алакрис) и даже в 3000 раз (Таблица б, обработанная ЛАУРА-11 + АЛАКРИС-11 лавровая листоблошка, 14-е сутки, праймеры Алакрис). Столь удивительное исчезновение мажорной полосы (напомню, что содержание 28S рРНК в клетке составляет 55%) следовало бы подтвердить и визуализировать в геле с помощью электрофореза общей РНК в нативных условиях. В связи с получением столь интересных результатов, следовало более подробно объяснить относительно чего определялось относительное содержание 28S рРНК в пробах с помощью ПЦР в реальном времени, поскольку при синтезе кДНК с «геноспецифичными обратными праймерами» невозможно использование какого-либо нецелевого референсного гена в одной и той же пробе. Кроме того, следовало бы указать примерное число оставшихся в живых после обработки особей, взятых для выделения РНК, при смертности 97-99 %. Это бы позволило показать, что высокая смертность не препятствовала выделению достаточных количеств РНК из оставшихся живых насекомых.

Название небольшого Раздела 4 «Сравнительная оценка эффективности применения олигонуклеотидных инсектицидов» представляется не совсем удачным. В подразделе 4.1 с похожим названием, в котором «оценка эффективности» лишь заменена на «анализ результатов», представлены усредненные результаты смертности 6 видов изученных вредителей после обработки 7 разработанными ДНК-олигонуклеотидами. Неясно, в чем заключается сравнительный характер такого анализа. В подразделе 4.2 действительно проводится сравнение РНК-инсектицидов и олигонуклеотидных инсектицидов, но только с точки зрения себестоимости их синтеза. Не совсем понятно, почему название раздела акцентирует внимание на сравнении эффективности применения и только олигонуклеотидных инсектицидов.

Молекулы дцРНК, имеющие размер в несколько сот пар нуклеотидов, под эту категорию явно не подходят.

В также небольшом Разделе 5 рассматривается вопрос об эффективности биodeградации изучаемых в работе олигонуклеотидных инсектицидов. Авторы ссылаются на литературные данные (Yang, 2011) о быстром разложении дцРНК и одноцепочечных ДНК под действием присутствующих в окружающей среде нуклеаз, а также приводят собственные данные об участии нуклеаз изучаемых вредителей и их растений-хозяев в гидролизе олигонуклеотидных инсектицидов.

По результатам обработки 6 видов вредителей 7 вариантами ДНК-олигонуклеотидов, в Заключении сделан основной вывод исследования о высокой биологической эффективности предложенных биоинсектицидов, вызывающих высокую смертность целевых объектов вредителей.

В качестве основного замечания при знакомстве с диссертационной работой Гальчинского Никиты Витальевича и другими работами этого научного коллектива следует признать несоответствие между блестящими результатами автора и его коллег при изучении возможности использования немодифицированных ДНК-олигонуклеотидов в области защиты растений и фактически полным отсутствием параллельных экспериментов по изучению этого вопроса в других лабораториях. При этом результаты этих интересных исследований опубликованы в различных высокорейтинговых статьях и хорошо известны научной общественности. В случае открытия явления РНК-интерференции в 1997-1998 гг., послужившей основой для создания дцРНК-инсектицидов, эффективность этого явления была одновременно подтверждена разными лабораториями на растениях, модельной нематоде, простейших и дрозофиле с быстрым ростом исследований в области функциональной геномики, биомедицины и защиты растений. В случае ДНК-олигонуклеотидов, все результаты исследований опубликованы членами одной научной команды. Было бы хорошо узнать, что диссертант думает по этому вопросу.

Несмотря на отмеченную диссертантом быструю деградацию нуклеиновых кислот в окружающей среде, что может действительно в значительной степени определять безопасность ДНК-олигонуклеотидов, эффективность подавления транскрипционной активности целевых генов этими молекулами очень высока. Поскольку идентичность с последовательностями полезных видов насекомых для 11-мерных олигонуклеотидов встречается достаточно часто, а КОККУС-11 имеет 100% гомологию с фрагментом 28S рРНК человека, хорошо бы рассмотреть подробнее вопрос о существовании какой-либо опасности использования ДНК-олигонуклеотидов для таких случаев.

Сразу следует отметить, что все приведенные в отзыве замечания носят дискуссионный

характер и не умаляют значимости диссертационной работы. Представленная на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук диссертация Гальчинского Никиты Витальевича выполнена на высоком научном и методическом уровне, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой решена важная задача – по результатам обработки 6 видов вредителей 7 вариантами ДНК-олигонуклеотидов сделан вывод о высокой биологической эффективности предложенных биоинсектицидов, вызывающих высокую смертность целевых объектов. вредителей.

Результаты исследования также исчерпывающе описаны и демонстрируют большой объем выполненной работы. Авторами предложен новый научно обоснованный подход к усовершенствованию регуляции численности насекомых-вредителей из подотряда грудохоботных отряда полужесткокрылых (Hemiptera), что может стать основой для широкого практического применения.

Выводы и результаты диссертации являются обоснованными. По актуальности проблемы, уровню методов, объему обработанного материала и научной новизне полученных результатов исследование Гальчинского Никиты Витальевича соответствует требованиям п. 9 “Положения о порядке присуждения ученых степеней”, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям, выдвигаемым на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук, а её автор заслуживает присвоения искомой степени по специальности 4.1.3 – Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений (сельскохозяйственные науки).

Я, Долгих Вячеслав Васильевич, согласен на размещение указанных персональных данных на официальном сайте организации и в единой информационной системе, включение указанных в отзыве персональных данных в аттестационное дело и их дальнейшую обработку.

Долгих Вячеслав Васильевич, доктор биологических наук по специальности 03.02.11 – Паразитология, заведующий лабораторией молекулярной защиты растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР)

Адрес: 196608, Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, д. 3

Телефон + 7 (812) 470-51-10

E-mail: info@vizr.spb.ru

23 марта 2026 г.

Подпись автора отзыва Долгих В.В. заверяю

