

На правах рукописи

ОБЕРЕМОК ВЛАДИМИР ВЛАДИМИРОВИЧ

**ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОНТРОЛЯ
ЧИСЛЕННОСТИ ЛИСТОГРЫЗУЩИХ НАСЕКОМЫХ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ДНК-ИНСЕКТИЦИДОВ**

03.02.08 – экология (биологические науки)
06.01.07 – защита растений

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Ялта – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»

Научный консультант: доктор сельскохозяйственных наук,
член-корреспондент РАН
Плугатарь Юрий Владимирович

Официальные оппоненты: **Симонович Елена Ильинична**
доктор биологических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет», доцент кафедры зоологии, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского;

Долженко Татьяна Васильевна
доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет», профессор кафедры защиты и карантина растений, Факультет агротехнологий, почвоведения и экологии

Дубовский Иван Михайлович
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный аграрный университет», профессор, заведующий лабораторией биологической защиты растений и биотехнологии, Агрономический факультет

Ведущая организация: Федеральное государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений».

Защита состоится «22» ноября 2019 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 900.011.01, ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» по адресу: 298648, Российская Федерация, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита, спуск Никитский, 52, e-mail: dissovet.nbs@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» по адресу: 298648, Российская Федерация, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита, спуск Никитский, 52, адрес сайта <http://nbgnsipro.com>

Автореферат разослан « » августа 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Корженевская Юлия Владиславовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Устойчивое развитие человеческого общества возможно только при разработке принципов и механизмов, способных обеспечить сохранение биоразнообразия и стабильного состояния природной среды и является одним из важных направлений популяционной экологии. 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.

Население мира будет увеличиваться и к 2050 году может достигнуть 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 (Sexton et al., 2007). При сохранении тенденции использования современных химических инсектицидов это подвергнет людей и окружающую среду значительно большей опасности и экологическим рискам. Таким образом, важным экологическим вопросом сегодня является разработка препаратов для контроля численности насекомых-вредителей, которые будут безопасными, доступными и одновременно эффективными в долгосрочной перспективе. 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 (Оберемок, 2008а; Oberemok et al., 2018), а также препараты на основе двухцепочечных РНК-фрагментов (Wang et al., 2011; Gu, 2013). Идея разработки и применения таких препаратов заключается в посттранскрипционной инактивации экспрессии функционально важных генов с помощью техник применения антисмысловых олигонуклеотидов (Dias, 2002; Sharma et al., 2014) и механизма РНК-интерференции (Fire et al., 1998; Terenius et al., 2011). Эффекты антисмысловых олигонуклеотидов во многом зависят от комбинации азотистых оснований и их последующего комплементарного спаривания с РНК-мишенью. Это простое матричное свойство нуклеиновых кислот привлекает ученых для создания активных инструментов воздействия на клетки организмов с перспективой их применения в различных областях народного хозяйства. Сельское и лесное хозяйство находятся в стадии становления данного направления исследований и разработки в основном сконцентрированы на применении фрагментов немодифицированных

нуклеиновых кислот (Gu, 2013; Oberemok et al., 2018), что связано с их коротким периодом полураспада и возможностью применения на обширных площадях природных сообществ и агроценозов.

Степень разработанности темы. К началу работы в 2008 г. в мировой литературе отсутствовали данные о возможности использования РНКазы Н-зависимых антисмысловых ДНК-олигонуклеотидов (Dias, 2002) в качестве контактных ДНК-инсектицидов для контроля численности листогрызущих насекомых. Первые эксперименты с ДНК-инсектицидами были проведены на непарном шелкопряде (Oberemok, 2008a). Некоторое время спустя появились данные о возможности создания контактных двухцепочечных РНК-инсектицидов для контроля численности листогрызущих насекомых (Belles, 2010; Wang et al., 2011), действующих по механизму РНК-интерференции, на поздних этапах которой образуются антисмысловые РНК-олигонуклеотиды. Эти факты говорили в пользу гипотезы о возможности использования антисмысловых ДНК-олигонуклеотидов в качестве активного инструмента контроля численности насекомых-вредителей. По результатам анализа мировой литературы было сделано предположение, что ДНК-инсектициды способны объединить в себе наилучшие качества современных инсектицидов: избирательность действия биологических препаратов и доступность с быстроедействием химических агентов. Западные учёные поддерживают идею контактных инсектицидов на основе нуклеиновых кислот, но пришли к ней позже и используют явление РНК-интерференции для создания таких препаратов, когда для борьбы с насекомыми-вредителями применяются относительно протяжённые двухцепочечные РНК-фрагменты (Belles, 2010; Wang et al., 2011; Yu et al., 2013). Имеется ряд преимуществ в использовании коротких (длиной 11-20 нуклеотидов) антисмысловых фрагментов ДНК по сравнению с РНК-препаратами. Это связано с тем, что относительно длинные фрагменты РНК (в большинстве случаев >200 п.н.) непредсказуемо расщепляются в клетках на малые интерферирующие РНК (длиной около 21-23 нуклеотидов), многие из которых совпадают с геномными участками нецелевых организмов (Lundgren, 2013; Zotti, 2015). Сейчас это практически непреодолимый барьер, приводящий к невозможности гарантировать специфичность и высокий уровень экологичности действия препаратов, основывающихся на РНК-интерференции, что значительно снижает перспективы их использования в качестве видоспецифичных инсектицидов. Кроме этого, синтез РНК сегодня на порядок дороже, чем синтез ДНК. Данный факт также добавляет существенную актуальность разработкам по созданию ДНК-инсектицидов.

Цель работы – на основе комплексного подхода выявить особенности влияния коротких антисмысловых фрагментов антиапоптозных генов и гена, кодирующего 5,8S рРНК, на насекомых и нецелевые организмы для разработки фундаментальных основ действия антисмысловых олигонуклеотидов на насекомых и создания ДНК-инсектицидов с высоким уровнем экологичности.

Задачи исследования:

- изучить влияние ДНК-инсектицидов и контрольных ДНК-фрагментов на биологические показатели целевых насекомых-вредителей;
- исследовать влияние ДНК-инсектицидов и контрольных ДНК-фрагментов на биологические показатели зараженных вирусом ядерного полиэдроза особей непарного шелкопряда (ВЯП НШ);
- установить особенность и специфичность ответа клеток непарного шелкопряда на действие ДНК-инсектицидов и контрольных ДНК-фрагментов;
- оценить избирательность и экологичность действия ДНК-инсектицидов и контрольных ДНК-фрагментов на нецелевых организмах.

Научная новизна. 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 антисмысловые фрагменты длиной 11 нуклеотидов. Показано, что контактная обработка листьев мяты перечной антисмысловым ДНК-фрагментом oligoMER-11, комплементарного к мРНК ментонредуктазы, приводит к снижению содержания ментола и увеличению содержания ментона.

Впервые обнаружен эффект повышения смертности непарного шелкопряда и шелкопряда-монашенки, заражённых ВЯП НШ и обработанных коротким антисмысловым фрагментом его антиапоптозного IAP-3-гена (oligoRING-фрагмент), что открывает перспективы в плане повышения эффективности действия бакуловирусных препаратов при помощи антисмысловых ДНК-олигонуклеотидов.

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании лабораторных и полевых экспериментов были получены новые представления, результаты и выводы, позволяющие расширить спектр безопасных подходов к контролю численности листогрызущих насекомых.

ДНК-инсектициды (oligoRING-инсектицид и oligoRIBO-11-инсектицид) могут найти своё применение в контроле численности непарного шелкопряда. OligoRING-инсектицид может быть использован для повышения эффективности вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда. В целом, разработанные ДНК-инсектициды показали возможность управления экосистемами при помощи антисмысловых олигонуклеотидов в целях народного хозяйства и заложили основу создания препаратов с высоким уровнем экологичности.

Полученные результаты о влиянии антисмысловых олигонуклеотидов на соотношение полов непарного шелкопряда и дрозофилы и накопление

вторичных метаболитов мятой перечной может найти самое широкое применение в защите растений и культивировании лекарственных и эфиромасличных растений.

Результаты диссертационного исследования используются в курсах лекций и на практических занятиях по экотоксикологии, экологической генетике и биохимии, физиологии и биохимии пестицидов, геномике и протеомике, технологии производства овощной продукции в Таврической академии и Академии биоресурсов и природопользования в ФГАОУ ВО "Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского".

Методология и методы исследований. Для решения поставленных задач использовались общепринятые методы экологии, генетики, биохимии, гистологии, органической и аналитической химии. Основу методологии составили ПЦР-анализ и ДНК-синтез.

Положения, выносимые на защиту:

1. Контактно применённые антисмысловые олигонуклеотиды (ДНК-инсектициды) снижают жизнеспособность целевых насекомых-вредителей (непарный шелкопряд, металлоидка серая, комар обыкновенный) и инсектицидный эффект достигается при использовании контактным путём от 1,8 до 180 нг целевого одноцепочечного ДНК-фрагмента на 1 мг биомассы насекомого.

2. OligoRING-фрагмент вызывает повышенную смертность заражённых ВЯП НШ гусениц непарного шелкопряда и шелкопряда-монашенки.

3. На безвирусных и заражённых ВЯП НШ гусеницах непарного шелкопряда методом анализа микросрезов тканей, детекции апоптотической "ДНК-лестницы" и анализа концентрации целевых мРНК и рРНК хозяина показано, что основными специфическими механизмами, обуславливающими гибель клеток насекомого, является апоптоз в случае oligoRING-фрагмента и снижение уровня биосинтеза белка в случае oligoRIBO-11-фрагмента.

4. Разработанные против непарного шелкопряда oligoRIBO-11- и oligoRING-инсектициды не оказывают существенного негативного влияния на жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга быка домашнего, на смертность и накопление биомассы нецелевых насекомых (каролинский бражник, совка-ипсилон, шелкопряд-монашенка, самшитовая огнёвка, колорадский жук, восковая моль), на угнетение экспрессии гена рибулозобифосфаткарбоксилазы картофеля обыкновенного, а также биохимические показатели дуба черешчатого и яблони домашней (содержание глюкозы и активность щелочной фосфатазы) и накопление биомассы растениями (пшеница мягкая); в течение суток деградируются дезоксирибонуклеазами дуба пушистого и непарного шелкопряда, не накапливаясь в тканях.

Степень достоверности. Достоверность результатов и обоснованность научных положений подтверждены большим массивом проанализированных данных полевых и лабораторных исследований, репрезентативностью выборки, применением современных статистических методов анализа, программного

обеспечения и критериев оценки. Для статистических расчётов использовались стандартные методы (Рокицкий, 1973) и программа STATISTICA 7. В графиках и таблицах обозначены средние и ошибки средних.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены на 23 международных научных и научно-практических конференциях, в том числе на IX Международной научной конференции "Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты" (Минск, 7-11 сентября 2015), на Международной конференции "Мониторинг и биологические методы контроля вредителей и патогенов древесных растений: от теории к практике" (Москва, 18-22 апреля 2016), на XII Европейском биотехнологическом конгрессе (Аликанте, Испания, 7-9 ноября 2016), на Всемирном съезде по биологии *in vitro* (Роли, США, 10-14 июня 2017).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 50 научных работ, 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.

Личный вклад соискателя. 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.

Структура и объем работы. 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.

Благодарности. Автор выражает благодарность своему научному консультанту, доктору сельскохозяйственных наук, чл.-корреспонденту РАН, Ю.В. Плугатарю, доктору медицинских наук А.В. Кубышкину, докторам биологических наук И.В. Митрофановой и В.В. Корженевскому, доктору сельскохозяйственных наук Е.Б. Балыкиной, а также кандидату биологических наук Ю.В. Корженевской за всестороннюю поддержку и ценные советы при подготовке диссертации.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 18-316-00063\18.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

РАЗДЕЛ 1 БИОЛОГИЯ ИНСЕКТИЦИДОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Обзор посвящён проблемам применения современных инсектицидов, а также актуальности и перспективам создания ДНК-инсектицидов с высоким уровнем экологичности. По сути, развиваясь по спирали, история применения инсектицидов в лице препаратов на основе нуклеиновых кислот снова вернулась к инсектицидам природного происхождения.

РАЗДЕЛ 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основными объектами исследования были непарный шелкопряд *Lymantria dispar* L. и его вирус ядерного полиэдроза, а также одноцепочечные фрагменты антиапоптозных генов и гена, кодирующего 5,8S рРНК. Эксперименты были проведены в лаборатории ДНК-технологий, ПЦР-анализа и разработки ДНК-инсектицидов и на модельных участках в природе в горном Крыму (северный макросклон гор) в предгорном поясе (лесостепной подпояс) и поясе дубовых лесов (подпояс пушистого дуба).

Бакуловирусные препараты, а также насекомые для исследований были любезно предоставлены Эрню Э.А. (Университет Франсуа Рабле, г. Тур, Франция) и Гниненко Ю.И. (Всероссийский научно-исследовательский институт лесоводства и механизации лесного хозяйства, г. Пушкино). Часть насекомых была собрана в лесных и парковых насаждениях Крыма.

Эксперименты по выделению, амплификации и анализу нуклеиновых кислот были выполнены при помощи стандартных методов, описанных в руководстве Sambrook et al. (1989). Анализ изменения экспрессии генов с использованием красителя SYBR Green проводили по методике Bustin, Mueller (2005) с нормировкой по количеству выделенной РНК и использовали в среднем 3 мкг РНК для получения кДНК в каждой пробе. В качестве референсного гена использовался ген актина. Микросрезы гусениц окрашивали гематоксилином и эозином (Kiernan, 2008). Культивирование мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крупного рогатого скота проводили в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С по общепринятой методике (Семенова и др., 2014). Для анализа нуклеотидных последовательностей были использованы программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и ClustalW 2.0.3 (Thompson et al., 1994). Для создания ДНК-инсектицидов, контрольных ДНК-олигонуклеотидов и праймеров использовали базу данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Олигонуклеотиды были синтезированы преимущественно ЗАО "Евроген РУ" (г. Москва), а также собственноручно на находящемся в распоряжении лаборатории ДНК-синтезаторе ASM-800E (БИОССЕТ, Россия). Опыты имели от 3 до 9 повторностей по 15-30 особей для каждой повторности в группе.

РАЗДЕЛ 3 ВЛИЯНИЕ КОРОТКИХ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ ФРАГМЕНТОВ АНТИАПОПТОЗНЫХ ГЕНОВ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БЕЗВИРУСНОГО ШЕЛКОПРЯДА И ДРУГИХ НАСЕКОМЫХ

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

Инсектицидный эффект oligoRING-фрагмента наблюдался при контактном попадании олигонуклеотида в пределах от 3 до 30 пмоль на

гусеницу I-II возраста. На Рисунке 1 представлена динамика смертности гусениц непарного шелкопряда, которые были собраны в природе с 4-х модельных участков (близ Симферополя, Ялты и Алушты – 2 участка) и обработаны в лаборатории водой (контроль), водным раствором oligoRING-фрагмента и контрольными олигонуклеотидами (3 пмоль/гусеницу).

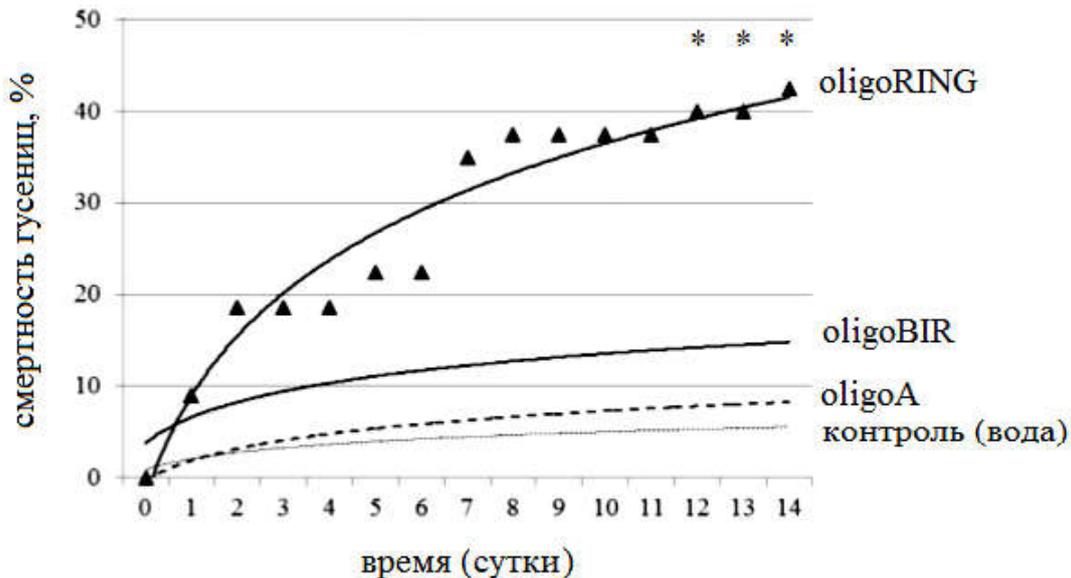


Рисунок 1 – Динамика смертности гусениц непарного шелкопряда после их контактной обработки водой, oligoRING-фрагментом (ДНК-инсектицид; антисмысловый фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ; 5'-CGACGTGGTGGCACGGCG-3'), oligoBIR-фрагментом (контрольный фрагмент; смысловый фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ; 5'-GCCGGCGGAACCTGGC CCA-3') и oligoA-фрагментом (контрольный фрагмент; 5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'). На графике представлена логарифмическая трендовая линия смертности. Достоверность смертности насекомого в группе "oligoRING" против контроля обозначена * при $p < 0,05$. Безвирусность гусениц была показана методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами к гену капсида p39 ВЯП НШ (Oberemok et al., 2016)

Процент погибших гусениц насекомого на 14-е сутки эксперимента составил в среднем $42,5 \pm 23,2\%$ в группе "oligoRING", $13,8 \pm 6,0\%$ в группе "oligoBIR", $9,0 \pm 3,1\%$ в группе "oligoA", и $7,5 \pm 1,8\%$ в контрольной группе, обработанной водой. Достоверность в смертности по сравнению с контролем была найдена на 14-е сутки только в группе "oligoRING" ($\chi^2=6,8$; $df=1$; $N=162$; $p < 0,05$). Нужно отметить, что сходный достоверный инсектицидный эффект ($p < 0,05$) был обнаружен на гусеницах металловидки серой *Trichoplusia ni* Hübner с использованием смеси oligoBIR-фрагмента и oligoRING-фрагмента IAP-3-гена её вируса ядерного полиэдроза при погружении на 5 минут насекомого в раствор с ДНК-фрагментами в концентрации 100 пмоль/мкл. Кроме этого, с помощью био-прилипателя "Липосам" (2 мкл на 1 мл среды) удалось существенно снизить концентрацию ДНК-инсектицида и достоверно

повысить смертность ($p < 0,05$) личинок комара обыкновенного *Culex pipiens* L. при использовании антисмыслового фрагмента его антиапоптозного IAP-1-гена в концентрации 2 пмоль на 1 мл водной среды, где выращивались личинки.

3.2 Снижение биомассы насекомого. Помимо уменьшения выживаемости насекомого-вредителя (Рисунок 1), также было обнаружено достоверное снижение в накоплении им биомассы под действием oligoRING-фрагмента ($p < 0,05$), что указывает на запуск апоптотических процессов в клетках (Hamshou et al., 2013) (Рисунок 2). Средние значения биомассы гусениц на 14-е сутки составили $180,5 \pm 27,4$ мг ($n=68$), $157,9 \pm 21,8$ мг ($n=62$) и $105,7 \pm 20,4$ мг ($n=44$) в контроле, группах "oligoBIR" и "oligoRING" соответственно.

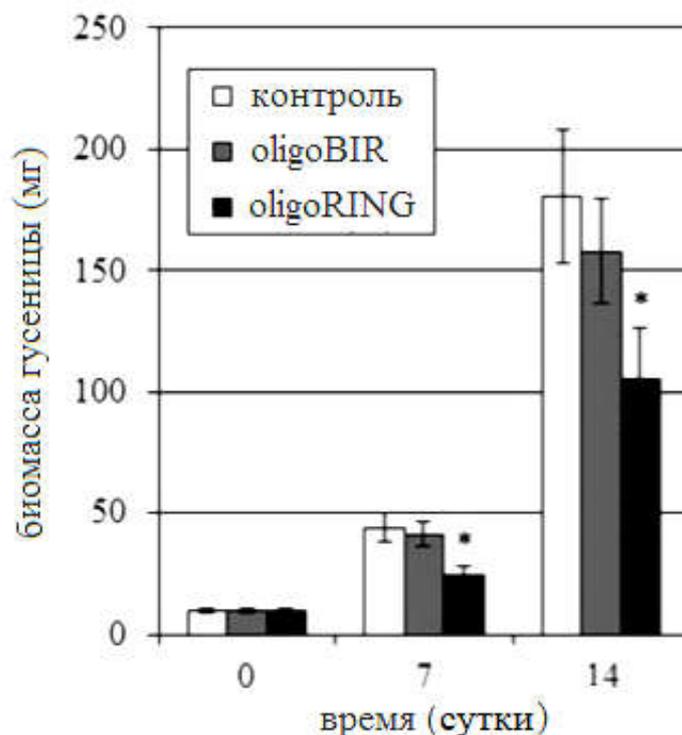


Рисунок 2 – Динамика накопления биомассы гусеницами непарного шелкопряда после их контактной обработки oligoRING-фрагментом, oligoBIR-фрагментом и водой. Достоверность снижения накопления биомассы насекомым в группе "oligoRING" против контроля обозначена * при $p < 0,05$

3.3 Уменьшение количества самок в обработанном oligoRING-фрагментом поколении. Было обнаружено, что средняя масса куколок насекомого из групп эксперимента, представленного на Рисунках 1 и 2, заметно различалась и составила $0,76 \pm 0,06$ г ($n=28$), $0,69 \pm 0,06$ г ($n=23$), $0,59 \pm 0,07$ г ($n=21$) в группе контроля, группе "oligoBIR" и группе "oligoRING" соответственно (Рисунок 3). В группе "oligoRING" она была достоверно ниже по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Известно, что имаго непарного шелкопряда обладают половым диморфизмом и самки крупнее самцов, а куколки самок в среднем в 2,2 раза крупнее куколок самцов (Vabaei et al., 2009). Было сделано предположение, что в контрольной группе окажется больше самок насекомого, чем в группе "oligoRING". Частота самок составила 0,63 в группе контроля против 0,38 в

группе "oligoRING" ($\chi^2=4,09$; $df=1$; $N=49$; $p<0,05$). Таким образом, 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.

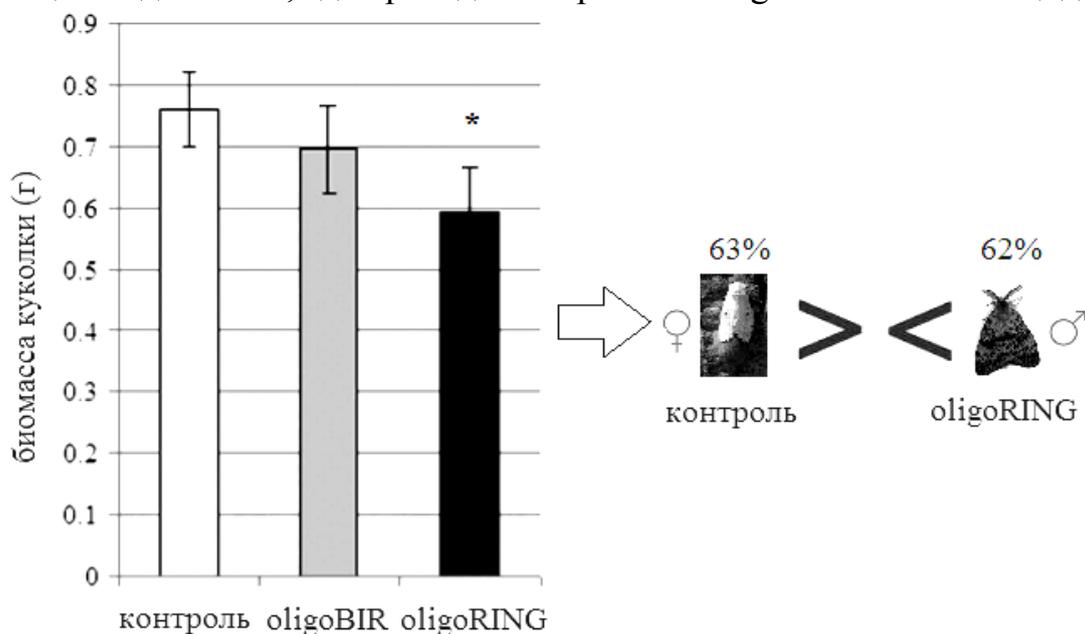


Рисунок 3 – Средняя масса куколок в группе контроля, группе "oligoBIR" и группе "oligoRING". Достоверность различия средней массы куколок в группе "oligoRING" против контроля обозначена * при $p<0,05$

Было решено исследовать распространённость феномена уменьшения количества морфологических самок в потомстве среди насекомых и проведены опыты на личинках плодовой мушки *Drosophila melanogaster* Meigen дикого типа с использованием антисмыслового oligoDIAP-2(-)-фрагмента её антиапоптозного IAP-2-гена в 9 повторностях. Было обнаружено, как и в случае с непарным шелкопрядом, что в группе "oligoRING" на 24% реже формировались самки дрозофилы ($p<0,05$), чем в контроле, и преобладали морфологические самцы. Таким образом, обнаруженное явление не является одиночным в природе. Антиапоптозные белки являются многофункциональными сигнальными молекулами, которые влияют на различные биологические процессы (Leulier et al., 2006), в том числе клеточные механизмы, ответственные за определение пола. По-видимому, антисмысловые олигонуклеотиды IAP-генов опосредовано способны влиять на альтернативный сплайсинг гена-"переключателя" sex-lethal, ответственного за возникновение пола у дрозофилы (Salz, Erickson, 2010).

3.4 Переход инсектицидного эффекта oligoRING-фрагмента в следующее поколение – повышение содержания кальция и магния в тканях яиц шелкопряда и снижение скорости развития эмбрионов. Было сделано предположение, что наблюдаемые биологические эффекты на стадии гусеницы, куколки и имаго в тканях насекомого вызваны апоптотическими процессами. Внутри каждой группы эксперимента вышедшие из куколок

(Рисунок 3) самки и самцы были скрещены в отдельных контейнерах. Отложенные самками яйца были проанализированы на содержание в них кальция и магния. Данные макроэлементы являются одними из основных в клетке и необходимы для активизации $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимых эндонуклеаз, участвующих в деградации ДНК во время апоптоза (Elmore, 2007).

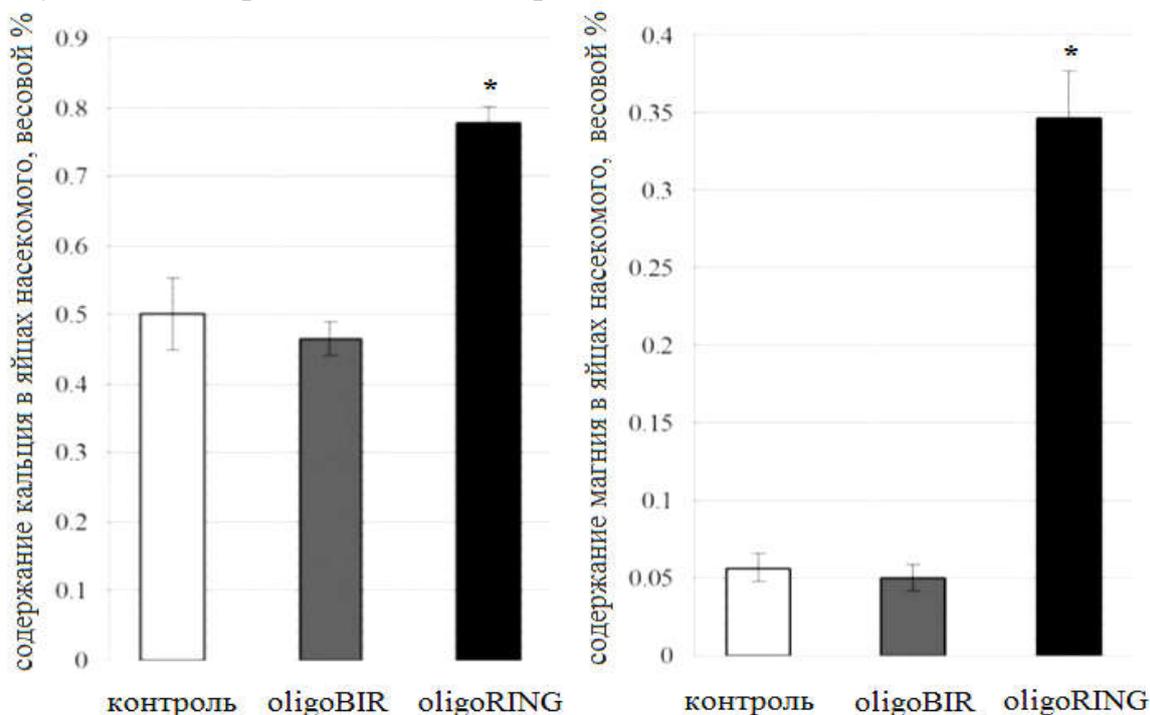


Рисунок 4 – Весовой процент содержания кальция и магния в яйцах самок непарного шелкопряда, выживших в ходе эксперимента. Достоверность различий содержания кальция и магния в группе "oligoRING" (n=3; по 100 яиц) против контроля (n=3; по 100 яиц) обозначена * при $p < 0,05$

Было обнаружено достоверно более высокое содержание кальция и магния в яйцах насекомого группы "oligoRING" по сравнению с контролем. Если весовой процент содержания кальция в сухом веществе яиц насекомого группы "oligoBIR" и контроля составил $0,46 \pm 0,02\%$ и $0,5 \pm 0,06\%$ соответственно, то в группе "oligoRING" он был $0,78 \pm 0,02\%$. Аналогичная картина была получена для весового процента магния, который составил $0,35 \pm 0,06\%$, $0,05 \pm 0,02\%$, $0,06 \pm 0,02\%$ в группах "oligoRING", "oligoBIR" и контроля соответственно (Рисунок 4). Яйцо шелкопряда не способно самостоятельно накапливать кальций и магний, а является частью тканей самки шелкопряда, в которых накопились данные макроэлементы на стадии гусеницы во время активного кормления насекомого. Имаго непарного шелкопряда не питается. Нужно отметить, что яйца непарного шелкопряда из группы "oligoRING" (n=300) обладали более высокой средней массой по сравнению с контролем (n=300), $0,689 \pm 0,008$ мг против $0,639 \pm 0,004$ мг соответственно, через 75 суток после того, как они были отложены самками ($p < 0,05$). Размер (диаметр) яиц был практически одинаковым и составил в среднем $1,23 \pm 0,035$ мм (n=30) и $1,214 \pm 0,036$ мм (n=30) в группе "oligoRING" и контроля соответственно. Это указывает на замедление развития эмбрионов шелкопряда и медленным

уменьшением дейтоплазмы яиц. Таким образом, 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, снижение скорости развития эмбрионов), которые сопровождают его до следующей генерации (яйца насекомого) включительно. Ни один из существующих сегодня химических инсектицидов не обладает таким широким спектром действия на целевых насекомых-вредителей.

Возникновение резистентности к инсектицидам является одной из серьёзных экологических проблем, которая затрудняет совершенствование методов регуляции численности насекомых и подталкивает исследователей постоянно разрабатывать новые препараты (Weston et al., 2013). Важно отметить, что ДНК-инсектициды могут улучшить состояние проблемы возникновения устойчивости к инсектицидам со стороны насекомых. Если для их создания будут использованы короткие антисмысловые фрагменты из консервативных частей (например, RING-домена) антиапоптозных генов, то устойчивость к таким инсектицидам будет расти медленнее. Это связано с тем, что мутации в консервативном участке гена возникают реже, поэтому и реже будет изменяться целевой участок мРНК, с которым комплементарно будет взаимодействовать целевой антисмысловый олигонуклеотид для блокировки синтеза соответствующего антиапоптозного белка (Sharma et al., 2014). Полученные данные позволяют по-новому подойти к контролю численности непарного шелкопряда и других листогрызущих насекомых, а также использовать данный подход в антирезистентных программах.

РАЗДЕЛ 4 ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТА ПОВЫШЕНИЯ СМЕРТНОСТИ ГУСЕНИЦ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА, ЗАРАЖЁННЫХ ВИРУСОМ ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА И ОБРАБОТАННЫХ КОРОТКИМ АНТИСМЫСЛОВЫМ ФРАГМЕНТОМ ЕГО АНТИАПОПТОЗНОГО IAP-3-ГЕНА

Обнаруженная ДНК-инсектицидная активность может внести свой вклад в разработку фундаментальных основ биологического действия антисмысловых олигонуклеотидов на насекомых и стать решением ещё одной актуальной проблемы сельского и лесного хозяйства, связанной с повышением скорости действия бакуловирусных препаратов. Бакуловирусы в ходе эволюции "научились" противостоять преждевременной гибели зараженных ими клеток насекомых. Они обладают арсеналом антиапоптозных белков (Srinivasula, Ashwell, 2008), которые либо сами противостоят клеточным апоптозным белкам, либо способны изменить активность клеточных генов, что приводит к сдвигу баланса сил в сторону клеточных антиапоптозных белков (Агол, 1997). Это даёт время размножиться вирусу в клетках насекомого.

4.1 Повышение смертности гусениц, которых заразили ВЯП НШ в лабораторных условиях. В первых экспериментах по разработке ДНК-инсектицидов антисмысловый oligoRING-фрагмент и смысловый oligoBIR-

фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ использовались совместно. Было обнаружено, что данные фрагменты не всегда оказывают инсектицидный эффект на безвирусных насекомых, выращенных в лаборатории. Однако после заражения гусениц ВЯП НШ и обработки фрагментами IAP-3-гена ВЯП НШ наблюдалось достоверное повышение смертности насекомого по сравнению как с незаражённым, так и заражённым контролем (Рисунок 5). Перед обработкой ДНК-олигонуклеотидами гусениц кормили в течение 2-х суток на питательной среде, содержащей 10^4 вирусных полиэдров на мг среды, а после заражения – на безвирусной среде. Эффективность заражения гусениц ВЯП НШ была показана методом ПЦР со специфическими праймерами к гену капсида р39 ВЯП НШ (Oberemok et al., 2016) и составила 28,6% на 5-е сутки после заражения. В эксперименте использовались гусеницы 3-х яйцекладок.

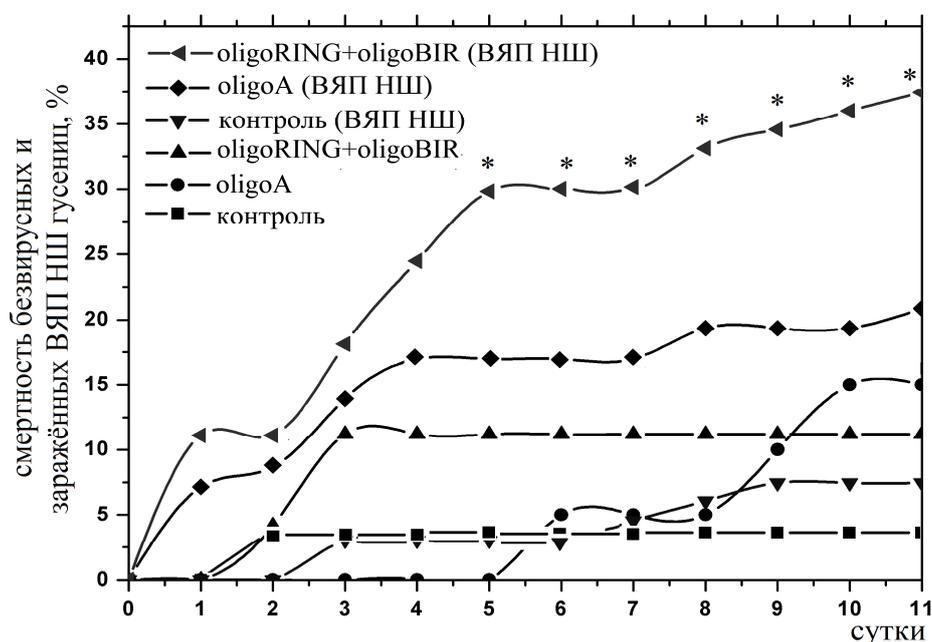


Рисунок 5 – Динамика смертности безвирусных и заражённых ВЯП НШ гусениц, которые были контактно обработаны водой, oligoA-фрагментом (контрольный фрагмент; 5'-(A)₁₈-3'), oligoRING-фрагментом (ДНК-инсектицид; антисмысловый фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ; 5'-CGACGTGGTGGCACGGCG-3') и oligoBIR-фрагментом (контрольный фрагмент; смысловой фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ; 5'-GCCGGCGGAACCTGGCCCA-3'). Изображена кумулятивная кривая со средней смертностью в сутки. Достоверность смертности насекомого в группе "oligoRING+oligoBIR" против заражённого контроля обозначена * при $p < 0,05$

Смертность безвирусного насекомого в течение 11 суток во всех группах эксперимента наблюдалась в пределах 3-15%. Заражённые ВЯП НШ и обработанные фрагментами IAP-3-гена вируса (oligoBIR-фрагмент+oligoRING-фрагмент) насекомые (30 пмоль/гусеницу, по 15 пмоль каждого из фрагментов ДНК) на 5-е сутки показали достоверно более высокую смертность по сравнению с контролем, 29,8% против 3,1% соответственно ($\chi^2=12,01$; $df=1$; $N=127$; $p < 0,05$). К 11-му дню смертность возросла и составила 37,5% в группе "oligoRING+oligoBIR" против 7,5% в контроле ($\chi^2=13,1$; $df=1$; $N=127$; $p < 0,05$).

Нужно отметить, что смысловой oligoBIR-фрагмент не "скрыл" инсектицидный эффект антисмыслового oligoRING-фрагмента за счёт несовершенного спаривания с ним. Этот факт открывает возможность совместного использования сразу нескольких антисмысловых олигонуклеотидов, которые будут несовершенны комплементарными по отношению друг к другу и совершенно комплементарными к целевым мРНК.

При понижении концентрации oligoRING-инсектицида до 3 пмоль/гусеницу также было обнаружено достоверное увеличение смертности насекомых по сравнению с контролем, что демонстрирует Рисунок 6. На нём представлены данные смертности гусениц непарного шелкопряда I возраста, предварительно заражённых ВЯП НШ в лаборатории и после этого обработанные oligoRING-фрагментом антиапоптозного IAP-3-гена вируса.

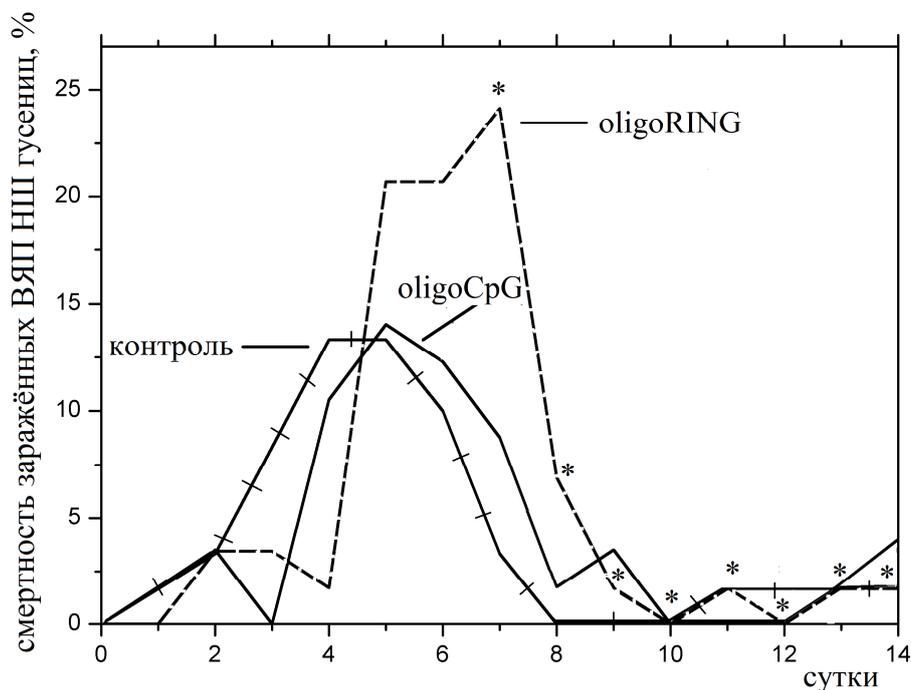


Рисунок 6 – Динамика смертности заражённых ВЯП НШ гусениц, контактно обработанных водой, oligoRING-фрагментом (ДНК-инсектицид; антисмысловый фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ; 5'-CGACGTGGTGGCACGGCG-3'), oligoCpG-фрагментом (контрольный фрагмент; 5'-CGCGCGCGCGCGCGCGCG-3'). Изображена некумулятивная кривая со средней смертностью в сутки для 3-х повторностей. Достоверность смертности насекомого в группе "oligoRING" против заражённого контроля обозначена * при $p < 0,05$

Гусениц заражали также, как и в опытах, результаты которых приведены на Рисунке 5. Эффективность заражения гусениц ВЯП НШ была определена методом ПЦР со специфическими праймерами к гену капсида р39 ВЯП НШ (Oberemok et al., 2016) и составила 50% на 5-е сутки после заражения. В эксперименте высокий уровень генетической гомогенности насекомого обеспечивался тем, что использовались гусеницы из одной яйцекладки. Смертность в безвирусном контроле на 14-е сутки составила 7,9%.

На 7-е сутки после обработки гусениц ДНК-олигонуклеотидами достоверное увеличение смертности заражённых насекомых по сравнению с контролем (вода) было обнаружено только в группе "oligoRING" ($\chi^2 = 5,51$; $p < 0,05$; $df=1$; $N=118$). В среднем погибло 53,3%, 50,9%, и 74,1% особей из групп контроля, "oligoCpG" и "oligoRING" соответственно (Рисунок 6). На 14-е сутки эксперимента число погибших насекомых повысилось и достигло 63,3% контрольной группы и 87,9% в группе "oligoRING" ($\chi^2 = 9,63$; $df=1$; $N=118$; $p < 0,01$). Таким образом, oligoRING-фрагмент на фоне бакуловирусной инфекции достоверно повышал смертность непарного шелкопряда за отведённый промежуток времени по сравнению с контролем.

4.2 Снижение биомассы гусениц, которых заразили ВЯП НШ в лабораторных условиях. Результаты исследования накопления биомассы заражёнными гусеницами непарного шелкопряда после обработки ДНК-олигонуклеотидами представлены на Рисунке 7.

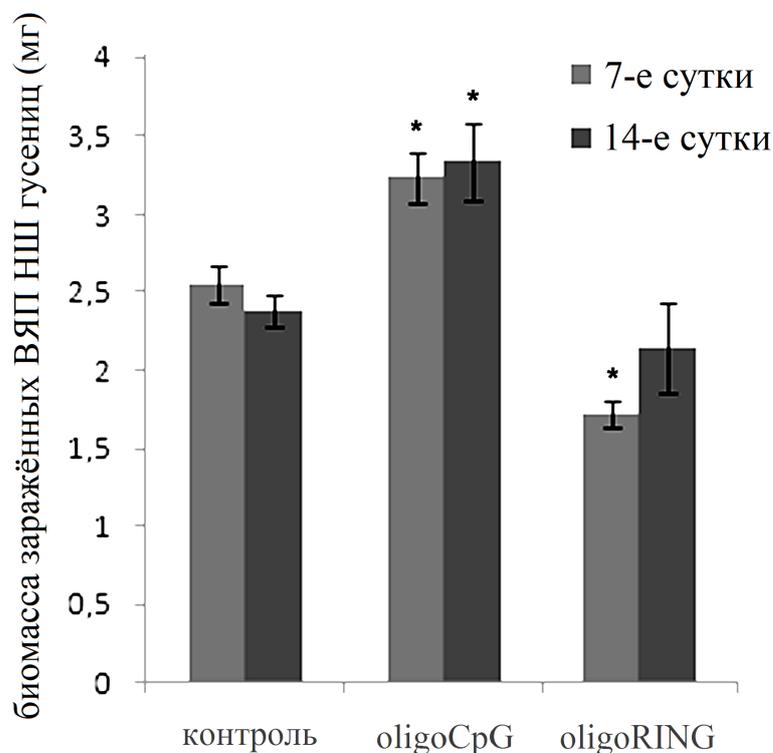


Рисунок 7 – Динамика накопления биомассы заражёнными ВЯП НШ гусеницами шелкопряда после их контактной обработки oligoRING-фрагментом, oligoCpG-фрагментом и водой. Достоверность снижения биомассы насекомого в группе "oligoRING" против контроля обозначена * при $p < 0,05$

Уже на 7-е сутки в экспериментальной группе "oligoRING" было обнаружено достоверное снижение биомассы гусениц, которое составило $1,72 \pm 0,05$ мг ($n=15$) против $2,55 \pm 0,07$ мг ($n=28$) в контроле ($p < 0,05$). Напротив, в группе "oligoCpG" было зафиксировано достоверное повышение биомассы на 7-й и 14-й дни и составило соответственно $3,27 \pm 0,09$ мг ($n=28$) и $3,34 \pm 0,14$ мг ($n=22$) против $2,55 \pm 0,07$ мг ($n=28$) и $2,38 \pm 0,06$ мг ($n=22$) в контроле ($p < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о специфичности эффекта, который зависит от нуклеотидного состава применяемого ДНК-фрагмента.

Аналогичный инсектицидный эффект был установлен и на близкородственном непарному шелкопряду виде – шелкопряде-монашенке. OligoRING-фрагмент вызвал достоверно более высокую смертность заражённых в лаборатории ВЯП НШ гусениц шелкопряда-монашенки *Lymantria monacha* L. ($p < 0,05$). Напротив, не было зафиксировано существенной смертности заражённых ВЯП НШ и обработанных oligoRING-фрагментом личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say из отряда жёсткокрылых и плодовой мушки *Drosophila melanogaster* Meigen из отряда двукрылых. Таким образом, обнаруженный эффект распространяется только на близкородственные непарному шелкопряду виды.

Также был получен инсектицидный эффект при использовании антисмыслового oligoRING-фрагмента антиапоптозного IAP-2-гена ВЯП НШ (5'-TGAACCTCGACGCTCTTGTCSS-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 каждая ($p < 0,05$). Очевидно, что это происходило в результате контакта oligoRING-фрагмента с покровами гусениц во время их кормления, так как в кишечнике насекомых содержатся фосфодиэстеразы (дезоксирибонуклеазы), разрушающие попавшие с пищей олигонуклеотиды до мономеров, уничтожая содержащуюся в их последовательности информацию.

4.3 Повышение смертности гусениц, которые были заражены ВЯП НШ в природе. Известно, что в природе ВЯП НШ может передаваться трансвариально, а поэтому вылупившиеся из яиц гусеницы могут быть заражены вирусом (Бахвалов, 2012), особенно в местах обработок бакуловирусными препаратами. В таких случаях осуществлять контроль вредителя можно, обрабатывая гусениц oligoRING-фрагментом без предварительного заражения вирусом.

Таблица 1 – Динамика смертности заражённых в природе гусениц непарного шелкопряда после обработки ДНК-олигонуклеотидами

	Контроль	oligoCpG	oligoRING
5-е сутки	17,8 ± 9,6%	16,9 ± 10,1%	39,3 ± 9,3%*
10-е сутки	23,3 ± 13,3%	22,6 ± 12,9%	51,7 ± 11,3%*

Достоверность различий смертности насекомого в группе "oligoRING" против контроля (10-е сутки) обозначена * при $p < 0,05$ ($\chi^2 = 19,63$; $df=1$; $N=187$).

В Таблице 1 представлены данные смертности после обработки ДНК-олигонуклеотидами (30 пмоль/гусеницу) заражённых ВЯП НШ гусениц непарного шелкопряда II возраста из 3-х яйцекладок в 9 повторностях. Заражённость гусениц I возраста, вылупившихся из инфицированных ВЯП НШ яиц насекомого, была показана методом ПЦР со специфическими праймерами к гену капсида p39 ВЯП НШ (Oberemok et al., 2016) и составила 60%.

Бакуловирусы повсеместно встречаются в природе, являясь важным регулятором численности чешуекрылых с высоким уровнем экологичности. Это делает их актуальными агентами для биологической борьбы с насекомыми-вредителями, действующими эффективно, но медленно. Это серьезный недостаток, который способствует созданию большого числа рекомбинантных бакуловирусов, убивающих насекомых быстрее, чем вирус-прародитель дикого типа (Moscardi et al., 2011). Однако пока в продаже не существует инсектицидов на основе рекомбинантных бакуловирусов (Beas-Catena et al., 2014). В такой ситуации определённно не хватает нового подхода к данной проблеме, который бы опирался на безопасный и одновременно доступный способ увеличения эффективности действия бакуловирусных препаратов. Результаты показывают, что антисмысловой oligoRING-фрагмент повышает смертность заражённых в природе ВЯП НШ гусениц непарного шелкопряда достаточно быстро, через 5 суток ($\chi^2 = 12,7$; $df=1$; $N=127$; $p<0,05$), увеличивая этим эффективность действия бакуловирусных препаратов. Таким образом, на следующий год после обработки бакуловирусными препаратами, на том же участке леса можно применить oligoRING-фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ в качестве ДНК-инсектицида для гусениц, которые получили бакуловирус трансвариально или заразились им горизонтально в природе.

РАЗДЕЛ 5 ОБНАРУЖЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА НА ДЕЙСТВИЕ OLIGORING-ФРАГМЕНТА АНТИАПОПТОЗНОГО IAP-3-ГЕНА ВЯП НШ У БЕЗВИРУСНЫХ И ЗАРАЖЁННЫХ ЭТИМ ВИРУСОМ ГУСЕНИЦ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА

Эксперименты показывают, что, несмотря на дополнительные барьеры, контактный путь доставки химических инсектицидов (Sugiura et al., 2008) и нуклеиновых кислот через покровы насекомых в клетки эффективен (Huvenne, Smaghe, 2010; Wang et al., 2011; Yu et al., 2013). Одноцепочечные фрагменты ДНК попадают в клетки путём активного транспорта (Loke et al., 1989; de Diesbach, 2000). Попав в клетки, антисмысловые олигонуклеотиды способны влиять на их функционирование через блокировку экспрессии целевых генов по механизму действия РНКазы Н-зависимых антисмысловых олигонуклеотидов (Dias, Stein, 2002). Именно степень экспрессии определённых генов на молекулярном уровне обуславливает функциональность клеток и в конечном итоге определяет их судьбу. Блокировка экспрессии антиапоптозных генов системы взаимоотношений вирус-хозяин может приводить к запрограммированной гибели клеток (апоптозу) насекомого-вредителя и иметь практическое значение для сельского и лесного хозяйства.

Нужно отметить, что в экспериментах более яркий эффект действия ДНК-инсектицида наблюдался на безвирусных гусеницах, собранных в природе, чем выращенных из яиц насекомого в лаборатории. Деграция антисмыслового oligoRING-фрагмента клеточными ДНКазами и взаимодействие его с целевой мРНК антиапоптозного гена являются теми двумя конкурирующими процессами, от которых зависит ответ клетки на применённый олигонуклеотид.

Очевидно, что в природе больше стресс-факторов (вирусы, ультрафиолет, вторичные метаболиты растений и др.), которые могут активизировать систему апоптоза-антиапоптоза насекомого и повысить концентрацию мРНК различных антиапоптозных генов насекомого, в том числе того, с которым взаимодействует oligoRING-фрагмент. В этой связи решалась задача обнаружения целевого антиапоптозного гена (IAP-Z) непарного шелкопряда, на экспрессию которого oligoRING-фрагмент будет действовать по механизму РНКазы Н-зависимых антисмысловых олигонуклеотидов (Sharma et al., 2014).

5.1 Безвирусные гусеницы непарного шелкопряда. Филогенетический анализ системы взаимоотношений вирус-хозяин показывает, что в ходе эволюции антиапоптозные гены, как и многие другие гены, были заимствованы вирусами ядерного полиэдроза у их хозяев и являются гомологичными им (Rollie, Passarelli, 2013), а иногда имеют с ними потрясающую схожесть (Cerio et al., 2010). На Рисунке 8 представлена электрофореграмма ампликонов, полученных на кДНК безвирусных особей шелкопряда при помощи прямого праймера "oligoBIR" и обратного праймера "oligoRING". Длина образовавшегося ампликона составила 290 п.н.

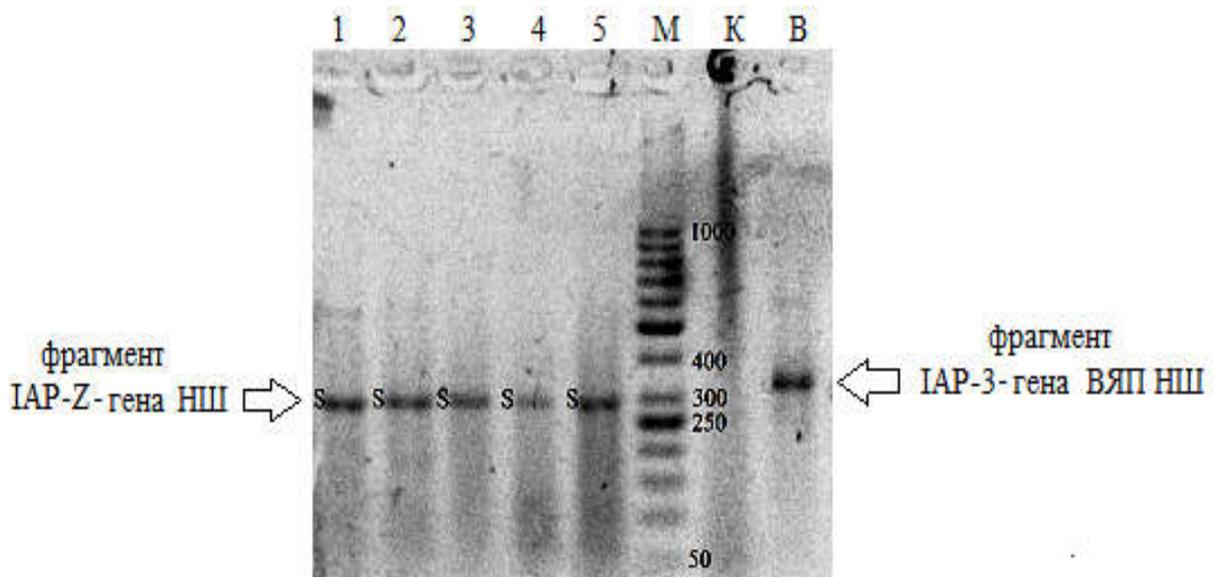


Рисунок 8 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК с oligoBIR- и oligoRING-фрагментом в качестве праймеров, которые были получены на кДНК безвирусных клеток шелкопряда: 1-5 – ампликоны фрагмента IAP-Z-гена шелкопряда (НШ); М – маркер молекулярных весов ДНК; К – контроль; В – маркер ДНК из IAP-3-гена ВЯП НШ (Пинквир, Россия) длиной 317 п.н. (длина предсказана по имеющейся в GenBank последовательности ВЯП НШ)

Полученные ампликоны были секвенированы (Рисунок 9). Показано, что в безвирусных клетках непарного шелкопряда имеется целевая мРНК антиапоптозного гена (названного IAP-Z), которая обладает высокой степенью гомологичности антиапоптозному IAP-3-гену ВЯП НШ и имеет комплементарный oligoRING-фрагменту участок (Рисунок 9). Дополнительные исследования по секвенированию ДНК с использованием обратного праймера

(5'-CGCACGGCGCACAACAC-3; oligoRING-19+), отжигающегося на 19 нт правее от последовательности "oligoRING", также доказали наличие совершенно комплементарного oligoRING-фрагменту участок.

```

НШ IAP-Z GAGAAGCGGACGCCAAGATTTTGTGAGTGCGCCTATTGCCACATCGAAATCGGCAATTGG
В.ЯП НШ IAP-3 ---CCTCACGACGCCAGATTTTGTGAGTGCGCCTATTGCCACATCGAAATCGGCAATTGG
.. * . . . * .*****

НШ IAP-Z TCGATCGGCAGCGACGCCATGTCCGACCACAAGCGCTACTCGCCCGCTTGCCGGTTCGTC
В.ЯП НШ IAP-3 TCGATCGGCAGCGACGCCATGTCCGACCACAAGCGCTACTCGCCCGCTTGCCGGTTCGTC
*****

НШ IAP-Z TGCAGCTCATAAAGAGGCCCGTGTCCGCGTCCGAGCGGCAGACGACGACGACTAAGAC
В.ЯП НШ IAP-3 TGCAGCTCATAAAGAGGCCCGTGTCCGCGTCCGAGCGGCAGACGACGACGACGAAGAC
*****

НШ IAP-Z GACTACGAGGAGGACTCGGTCCGCGAGCCCGCCCGCGGCGGCGAGCTGCTGTCTCCGTT
В.ЯП НШ IAP-3 GACGAGGACTCGGGCGC---CGCCGAGCCCGCCCGCGGCGGCGAGCTGCTGTCTCCGTT
*** * ** ,** * * *****

НШ IAP-Z TGCCTGGACGCGCAACGCGAAATAATGTTTTCGCCGTGCCACCACGTCGA-----
В.ЯП НШ IAP-3 TGCCTGGACGCGCAACGCGAAATAATGTTTTCGCCGTGCCACCACGTCGCGG
*****

```

—————
комплементарен oligoRING

Рисунок 9 – Последовательность секвенированного фрагмента IAP-Z-гена непарного шелкопряда, выровненного по фрагменту IAP-3-гена ВЯП НШ. Звёздочками (*) отмечены места совпадений

Методом ОТ-ПЦР в реальном времени и специфических праймеров "oligoIAP-Z" (5'-AGGCCCGTGTCCGCGTCC-3') и "oligoRING" обнаружено снижение экспрессии целевого антиапоптозного IAP-Z-гена в $2,1 \pm 0,1$ раза в насекомых на 14-е сутки после обработки антисмысловым oligoRING-фрагментом (Рисунок 10). Таким образом, oligoRING-фрагмент снижает экспрессию антиапоптозного IAP-Z-гена, запуская апоптотические процессы в клетках насекомого.

Известно, что в клетке существуют белки системы апоптоза – антиапоптоза. Преобладание белков антиапоптоза сдерживает клетку от запрограммированной гибели, а преобладание апоптотических белков – наоборот (Агол, 1996). Рассматриваемую систему можно представить в виде "весов" апоптоза-антиапоптоза, на которые могут влиять различные факторы. Вследствие их влияния "весы" наклоняются в ту или другую сторону, пока не будет достигнута определённая критическая отметка, после которой формируется устойчивый сигнал к апоптозу или антиапоптозу (на некоторое время). OligoRING-фрагмент, блокируя экспрессию антиапоптозного IAP-Z-гена по механизму действия антисмысловых олигонуклеотидов (Sharma et al., 2014), смещает биохимические реакции клетки в сторону апоптоза (запрограммированной гибели) клетки. При массовой гибели клеток от апоптоза погибает и целый организм насекомого. В этом и состоит механизм инсектицидного действия oligoRING-фрагмента.

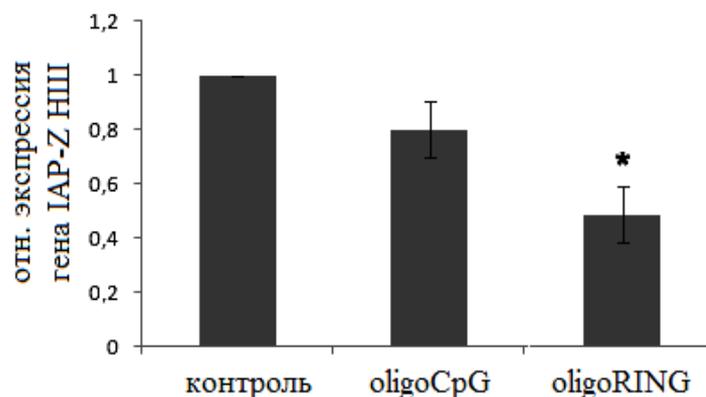


Рисунок 10 – Относительная экспрессия антиапоптозного IAP-Z-гена у выращенных в лаборатории безвирусных гусениц непарного шелкопряда на 14-е сутки после обработки водой и одноцепочечным oligoRING- и oligoCpG-фрагментом (3 пмоль/гусеницу). Экспрессия IAP-Z-гена в контрольной группе (вода) взята за 1 (100%). Снижение экспрессии IAP-Z-гена насекомого в группе "oligoRING" (n=3) против контроля (n=3) обозначено * при $p < 0,05$

Для оценки продолжительности действия oligoRING-фрагмента (3 пмоль/гусеницу) был применён анализ уровня экспрессии IAP-Z-гена у имаго выживших самок и самцов, которые были обработаны на стадии гусениц (раздел 3). Было обнаружено достоверное снижение экспрессии IAP-Z-гена в самках группы "oligoRING", в самцах же экспрессия целевого антиапоптозного гена была настолько снижена, что не поддавалась детекции (Таблица 2). Результаты, представленные в Таблице 2, свидетельствуют о долгосрочном снижении экспрессии целевого антиапоптозного IAP-Z-гена под влиянием антисмыслового oligoRING-фрагмента. Аналогичный эффект (снижение экспрессии целевого антиапоптозного DIAP-2-гена) был найден на имаго *D. melanogaster*, которые были обработаны антисмысловым oligoDIAP-2(-)-фрагментом на стадии личинки ($p < 0,05$).

Таблица 2 – Уменьшение (в количество раз) относительной экспрессии антиапоптозного IAP-Z-гена в группе имаго шелкопряда под влиянием ДНК-олигонуклеотидов

	контроль	oligoBIR	oligoRING
самцы	1	$1,4 \pm 1,2$	не обнаружена
самки	1	$4,5 \pm 1,9$	$12,1 \pm 1,5^*$

Достоверность различий в экспрессии IAP-Z-гена в группе "oligoRING" против контроля обозначена * при $p < 0,05$; экспрессия IAP-Z-гена (n=3) в контрольных группах (вода) (n=3) взята за 1 (100%).

Таким образом, достоверное снижение экспрессии целевого IAP-Z-гена соответствует "золотому стандарту" применения антисмысловых олигонуклеотидов, когда можно с уверенностью утверждать о специфичности инсектицидного эффекта, вытекающего из комплементарного взаимодействия

oligoRING-фрагмента с целевой мРНК и её дальнейшего разрушения с участием РНКазы H (Dias, Stein, 2002; Sharma et al., 2014).

Анализ микросрезов тканей гусениц также помог обнаружить апоптотические процессы в клетках шелкопряда на 14-е сутки после обработки oligoRING-фрагментом в концентрации 30 пмоль/гусеницу (Рисунок 11). При этом наибольшие разрушения тканей под действием oligoRING-фрагмента были обнаружены в покровной ткани и клетках эпителия кишечника.



Рисунок 11 – Световая микроскопия гистологических микросрезов гусениц непарного шелкопряда (увеличение $\times 40$ для фото А, Б и $\times 80$ для фрагмента фото Б); А (контроль, обработанный водой): 1 – внешние покровы, 2 – железистые клетки, 3 – пищевод, 4 – пигментные клетки с перегородкой, 5 – максиллы, 6 – мандибулы; Б (обработанная oligoRING-фрагментом гусеница, демонстрирующая выраженные разрушения тканей): 1 – внешние покровы, 2 – пигментные клетки с разрушенной перегородкой, 3 – отдельные кластеры эпителиальных клеток пищеварительной трубки, 4 – разрушенный ротовой аппарат, 5 – сердце, 6 – анальная часть пищеварительной трубки, 7 – клетки покровной ткани без признаков апоптоза, 8 – клетки покровной ткани с признаками апоптоза: конденсация (пикноз) и фрагментация хроматина (кариорексис), уменьшение объёма клеток, 9 – увеличенная в размерах вакуолизованная клетка. Микросрезы толщиной около 4 мкм были выполнены на микротоме "Ротмик-1" (Россия). Препараты были окрашены гематоксилином и эозином (БиоВитрум, Россия)

Таким образом, снижение экспрессии целевого антиапоптотического IAP-Z-гена, конденсация и фрагментация хроматина, а также уменьшение объёма безвирусных клеток непарного шелкопряда свидетельствует о запуске апоптотических процессов в клетках насекомого под действием антисмыслового oligoRING-фрагмента. Полученные результаты хорошо согласуются с представленными выше данными по снижению биомассы и увеличению смертности безвирусных насекомых (раздел 3).

5.2 Заражённые ВЯП НШ гусеницы непарного шелкопряда. В предыдущем подразделе показано, что фрагмент хозяйского антиапоптотического IAP-Z-гена обладает очень высокой степенью схожести ($>95\%$) с фрагментом IAP-3-гена ВЯП НШ. В случае заражения бакуловирусом в клетках непарного

шелкопряда будут присутствовать мРНК обоих целевых генов, которые имеют комплементарные oligoRING-фрагменту участки. Соответственно, oligoRING-фрагмент на фоне бакуловирусной инфекции будет участвовать в деградации как мРНК антиапоптозного IAP-3-гена вируса, так и мРНК антиапоптозного IAP-Z-гена хозяина и вызывать апоптоз в клетках шелкопряда. Следует иметь в виду, что бакуловирусы в ответ на инфекцию сдерживают апоптотические процессы в клетках благодаря антиапоптозным белкам IAP и P35, которые являются более устойчивыми, чем антиапоптозные белки хозяина (Vandergaast et al., 2015). Как следствие – совместная инактивация экспрессии антиапоптозных генов насекомого и вируса повлияет на ускорение наступления апоптоза клеток хозяина и гибель заражённого ВЯП НШ насекомого.

В группе "oligoRING" на 5-е сутки исследования (начало пика смертности, Рисунок 6) было обнаружено достоверное снижение на $36,6 \pm 7,1\%$ суммарной экспрессии хозяйского IAP-Z-гена и IAP-3-гена ВЯП НШ по сравнению с контролем (Рисунок 12). Это согласуется с представленными выше данными о том, что oligoRING-фрагмент вызывает снижение жизнеспособности и биомассы заражённых ВЯП НШ насекомых, запуская более выраженные апоптотические процессы в заражённых клетках по механизму действия РНКазы Н-зависимых антисмысловых олигонуклеотидов.

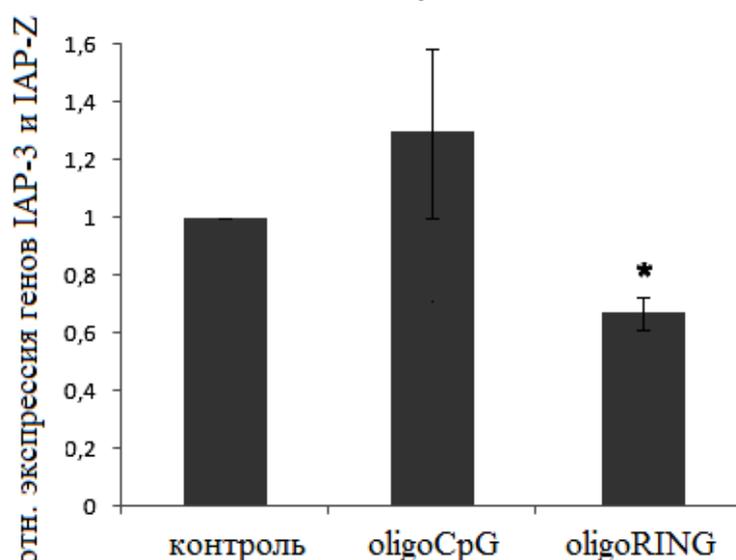


Рисунок 12 – Суммарная относительная экспрессия антиапоптозного IAP-Z-гена шелкопряда и IAP-3-гена бакуловируса у заражённых в лаборатории ВЯП НШ гусениц непарного шелкопряда на 5-е сутки после обработки водой и одноцепочечным oligoRING- и oligoCpG-фрагментом (3 пмоль/гусеницу). Суммарная экспрессия IAP-Z-гена и IAP-3-гена в контрольных группах (вода) взята за 1 (100%). Снижение экспрессии IAP-Z-гена и IAP-3-гена насекомого в группе "oligoRING" (n=3) против контроля (n=3) обозначено * при $p < 0,05$

С использованием метода детекции специфической "ДНК-лестницы" (Matassov et al., 2004), кратной 180-200 п.н., была изучена степень апоптотических процессов в погибших гусеницах из разных групп эксперимента на 5-е сутки после обработки ДНК-олигонуклеотидами. Из-за наличия вирусной инфекции апоптоз был обнаружен в гусеницах из всех групп эксперимента, но степень его проявления варьировала (Рисунок 13). Наиболее яркие апоптотические процессы в клетках непарного шелкопряда были обнаружены в группах "oligoRING" и "oligoRING+oligoBIR". В группе "oligoRING" была обнаружена самая глубокая деградация ДНК. ДНКазы практически полностью разрушили высшую фракцию (ВФ) ДНК, а также более высокие фракции апоптотической "ДНК-лестницы" клеток насекомого и сформировали единый фрагмент длиной около 100-180 п.н.

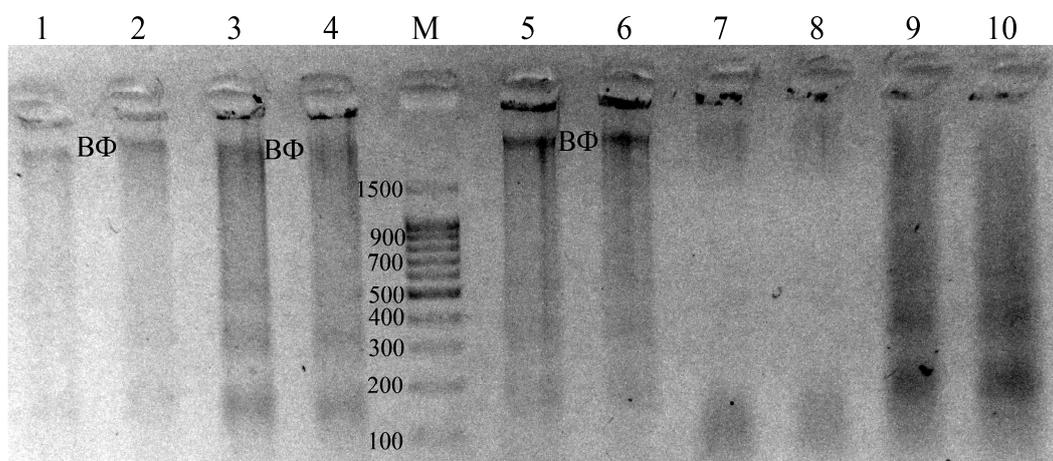


Рисунок 13 – Электрофореграмма апоптотической "ДНК-лестницы" (кратная 180-200 п.н. фрагментация ДНК), выделенной из тканей, заражённых ВЯП НШ гусениц из разных групп эксперимента: 1,2 – контроль; 3,4 – "oligo(A)"; М – маркер молекулярных весов ДНК; 5,6 – "oligoBIR"; 7,8 – "oligoRING"; 9,10 – "oligoBIR + oligoRING"; ВФ – высшая фракция геномной ДНК. Детекция апоптотической "ДНК-лестницы" была осуществлена при помощи "Quick apoptotic DNA ladder detection kit" (Life Technologies, США)

Таким образом, короткий антисмысловый oligoRING-фрагмент повышает смертность как безвирусных, так и заражённых вирусом гусениц непарного шелкопряда, запуская выраженные апоптотические процессы в клетках вредителя. Что касается практического использования этого явления, то здесь следует отметить отсутствие в настоящее время полных данных о последовательности нуклеотидов генома непарного шелкопряда, но секвенирована последовательность относительно короткого генома ВЯП НШ (Kuzio et al., 1999). Вирусная ДНК может дать ценную информацию о некоторых жизненно важных генах вируса, которые имеют клеточное происхождение, например, об антиапоптотических генах (Hughes, 2002), что было показано на примере IAP-Z-гена. Последовательность этих генов может быть использована при создании препаратов для борьбы с насекомым. Перспектива

такого подхода четко видна на практике, поскольку она обеспечивает инсектицидный эффект с меньшими усилиями. Например, вместо дорогого бакуловирусного препарата можно использовать короткие антисмысловые фрагменты антиапоптозных генов бакуловирусов, синтез которых на сегодня может быть полностью автоматизирован. Возможно также совместное применение в практике сельского и лесного хозяйства бакуловирусных препаратов и антисмысловых фрагментов антиапоптозных генов бакуловирусов с целью повышения эффективности первых. Такой подход может иметь перспективное значение для сельского и лесного хозяйства при дальнейшем снижении себестоимости ДНК-олигонуклеотидов, что сделает их ещё более конкурентоспособными по сравнению с химическими инсектицидами.

В процессе разработки oligoRING-инсектицида была выявлена проблема того, что некоторые выращенные в лаборатории безвирусные гусеницы младших возрастов оказываются устойчивыми к нему. В связи с этим была поставлена задача пополнить арсенал ДНК-инсектицидов антисмысловым олигонуклеотидом, который будет более универсален, чем oligoRING-инсектицид. Параллельно решалась задача уменьшения длины фрагмента с целью достижения уменьшения себестоимости препарата. Интерес распространился на рибосомальную РНК (рРНК) как еще одну перспективную мишень для ДНК-инсектицидов. В то время как мРНК составляет всего 5% клеточной РНК, рРНК, будучи более многочисленной, составляет 80% клеточной РНК и метаболически стабильна (Alberts et al., 2002; Warner, 1999), что делает рРНК перспективной мишенью для ДНК-инсектицидов.

РАЗДЕЛ 6 ДНК-ИНСЕКТИЦИД НА ОСНОВЕ АНТИСМЫСЛОВОГО ФРАГМЕНТА ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО 5,8S РИБОСОМАЛЬНУЮ РНК

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. Рассуждения относительно функции этой рРНК были сфокусированы на её роли в присоединении тРНК (Abou-Elela, Nazar, 1997; Lo et al., 1987) и транслокации рибосом (Graifer et al., 2005), по крайней мере в универсально-консервативной последовательности 5'-GAAC-3', которая является общей для всех 5,8S РНК (Nazar, 1982). Последовательность, окружающая данную консервативную область, часто видоспецифична (Abou-Elela, Nazar, 1997). Наиболее значительные и воспроизводимые ингибирования с несколькими различными немодифицированными антисмысловыми ДНК-олигонуклеотидами на ретикулоцитах кролика были получены для последовательностей, содержащих универсально консервативную область. Для экстракта ретикулоцитов кроликов максимальное ингибирование наблюдалось с антисмысловыми фрагментами длиной 10-11 нуклеотидов, а более длинные участки приводили к более

слабому ингибированию. Аналогичное снижение ингибирования наблюдалось с экстрактом зародышей пшеницы. Важно, что на экстрактах ретикулоцитов кролика и зародышей пшеницы было показано, что мутированные последовательности (даже однонуклеотидные мутации) существенно уменьшают уровень ингибирования (Walker et al., 1990), обеспечивая основу для избирательности действия. Исходя из этого, был разработан антисмысловой фрагмент длиной 11 нуклеотидов (5'-TGCGTTCGAAA-3', oligoRIBO-11-фрагмент), комплементарный участку 5,8S рРНК, который включает в себя универсально консервативную антисмысловую последовательность 5'-GTTC-3'. Данная последовательность была применена как контактный ДНК-инсектицид в экспериментах. Кроме этого, известно, что 5,8S рРНК одной из первой разрушается при иницировании апоптотических процессов в клетке (Mroczek, Kufel, 2008) и это является последовательным продолжением исследований в контексте полученных результатов с oligoRING-инсектицидом.

6.1 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. Исследования были проведены с использованием разновидности масс-спектрометрического метода – матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) (Hillenkamp, Karas, 2000) (Рисунок 14).

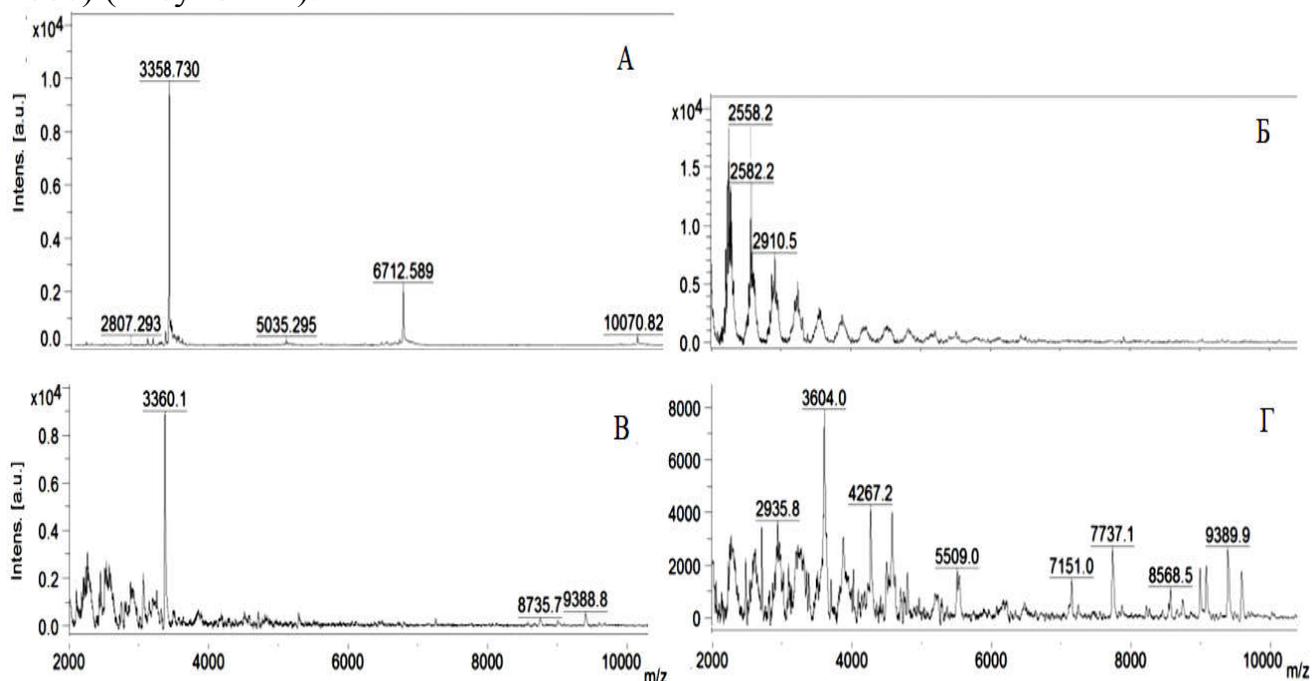


Рисунок 14 – Диаграмма пиков веществ, обнаруженных в образцах гомогената тканей отдельных гусениц шелкопряда после контактной обработки oligoRIBO-11-фрагментом (0,9 нмоль/гусеницу): А – эталон oligoRIBO-11-фрагмента (3358,73±10 Да), Б – контроль, В, Г – 30 и 60 минут после высыхания капли соответственно. Анализ всех образцов был проведён после 7 отмывок гусениц в воде и 70%-ном растворе спирта. Эксперимент был проведён трижды. Представлена характерная для каждой группы эксперимента диаграмма

МАЛДИ зарегистрировал проникновение oligoRIBO-11-фрагмента в клетки насекомого через 30 минут (пик 3360,1 Да) и значительный ответ клеток насекомого на применённый олигонуклеотид через 60 минут. В контрольной группе (без обработки) не было обнаружено характерного для oligoRIBO-11-фрагмента пика (Рисунок 14, Б). Кроме этого, в контрольной группе профиль регистрируемых пиков (пики 2558,2 Да, 2582,2 Да, 2910,5 Да) заметно отличался от групп эксперимента, что говорит не только о попадании олигонуклеотида в клетки насекомого, но и о синтезе новых веществ в ответ на применённый ДНК-фрагмент. Особенно много новых пиков на диаграмме было получено для образцов, которые были обработаны oligoRIBO-11-фрагментом в течение 60 минут (пики 2935,8 Да, 3604 Да, 4267,2 Да, 5509 Да, 7151 Да, 7737,1 Да, 8568,5 Да, 9389,9 Да). Исследования показали, что по своей природе значительное количество образованных веществ относится к олигонуклеотидам с более высокой молекулярной массой, чем oligoRIBO-11-фрагмент. Таким образом, короткие антисмысловые ДНК-олигонуклеотиды способны проникать через покровы непарного шелкопряда, запуская активный ответ клетки.

6.2 Антисмысловой oligoRIBO-11-фрагмент вызывает смертность гусениц непарного шелкопряда, выращенных в лаборатории и устойчивых к oligoRING-инсектициду. Используя гусениц непарного шелкопряда 2-го возраста, выращенных в лаборатории и устойчивых к oligoRING-инсектициду, на 3-е сутки после обработки обнаружено значительное увеличение смертности насекомых в группе "oligoRIBO-11" ($\chi^2=28,7$; $df=1$; $N=172$; $p<0,01$) по сравнению с контрольной группой, обработанной водой. В среднем, 35,3%, 8,3% и 4,2% гусениц погибли в группах, обработанных oligoRIBO-11-фрагментом, oligoRING-фрагментом и водой соответственно. В конце эксперимента, на 6-е сутки после обработки, oligoRIBO-11-фрагмент увеличил смертность насекомых по сравнению с контрольной группой, обработанной водой ($\chi^2 = 31,2$; $df=1$; $N=172$; $p<0,01$) и процент погибших насекомых достиг 48,1% (группа "oligoRIBO-11"), 11,4% (группа "oligoRING") и 11,1% (вода) (Рисунок 15). Таким образом, впервые удалось достоверно увеличить смертность гусениц непарного шелкопряда, выращенных в лаборатории и устойчивых к oligoRING-инсектициду, при помощи другого ДНК-инсектицида. Для выращенных в лабораторных условиях личинок восковой моли *Galleria mellonella* L. в течение 6 суток наблюдения после обработки oligoRIBO-11-фрагментом и oligoRING-фрагментом в концентрации 6 пмоль/гусеницу не было показано статистически достоверного эффекта ($p>0,05$) на жизнеспособность насекомого по сравнению с контролем (водой). Смертность во всех группах эксперимента составила 0%. Это объясняется тем, что у данного нецелевого чешуекрылого имеется не полностью комплементарный oligoRIBO-11-фрагменту участок 5,8S рибосомальной РНК – 5'-СТТСГААСГСА-3', что было обнаружено в ходе дополнительных исследований. Нужно отметить, что перед началом экспериментов средняя масса личинок восковой моли и непарного шелкопряда была одинаковой и составила $12,3\pm 1,2$ мг. Таким образом, oligoRIBO-11- и oligoRING-фрагмент

являются избирательными инсектицидами и специфичность их действия зависит от комбинации азотистых оснований.

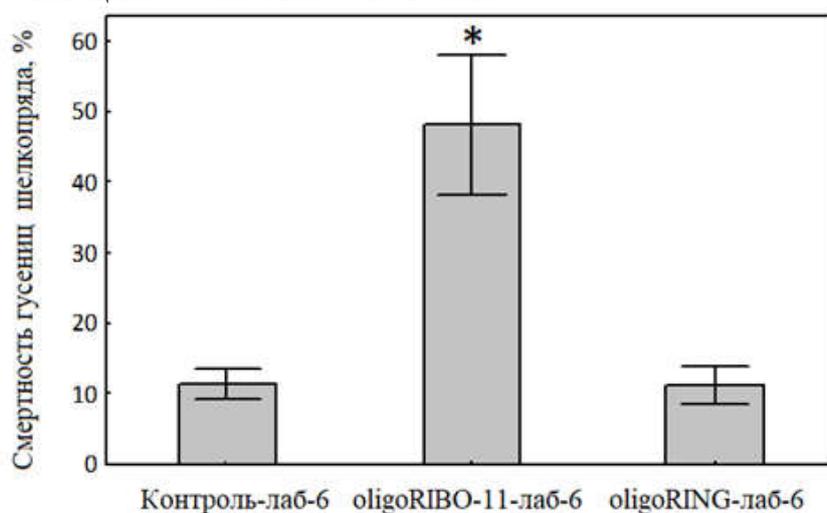


Рисунок 15 – Смертность гусениц шелкопряда, выращенных в лаборатории и устойчивых к oligoRING-инсектициду через 6 суток после контактной обработки oligoRIBO-11-фрагментом (6 пмоль/гусеницу). Достоверность различий по сравнению с контролем обозначено * при $p < 0,01$. Эксперимент имел 5 повторностей

6.3 OligoRIBO-11-фрагмент снижает концентрацию 5,8S рРНК в клетках гусениц непарного шелкопряда. Концентрация 5,8S рРНК у насекомых, обработанных oligoRIBO-11-фрагментом, была на 6-е сутки значительно ниже (в 16,5 раза) по сравнению с контролем, обработанным водой ($p < 0,01$, Рисунок 16). Таким образом, поддерживаемая oligoRIBO-11-фрагментом РНКазы Н-зависимая деградация целевой 5,8S рРНК, важной части белоксинтезирующего комплекса синтеза белка, была достаточно эффективной.

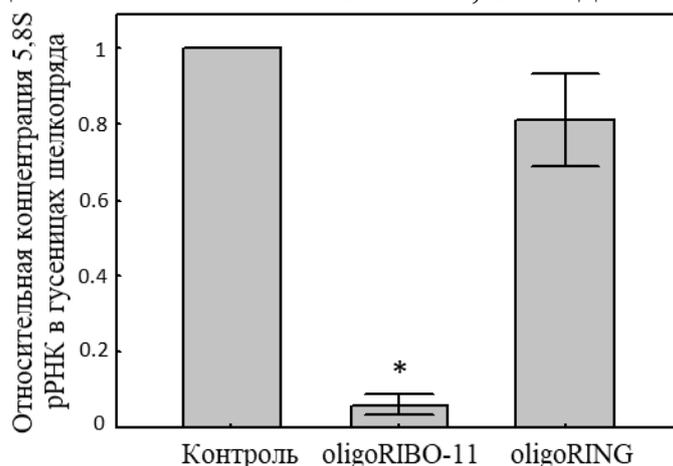


Рисунок 16 – Относительная концентрация 5,8S рибосомальной РНК в гусеницах непарного шелкопряда через 6 суток после обработки олигонуклеотидами. На графике представлены средние значения и стандартные ошибки средних для 3 повторностей по сравнению с контрольной группой, обработанной водой. Достоверность различий между группой "oligoRIBO-11" и контрольной группой (вода) обозначена * при $p < 0,01$

Было получено снижение на 94% ее концентрации, что соответствует достоверному увеличению смертности от контактного применения oligoRIBO-11-фрагмента (Рисунок 16). Таким образом, олигоRIBO-11-фрагмент, как и oligoRING-фрагмент, работает по механизму действия РНКазы Н-зависимых антисмысловых олигонуклеотидов.

6.4 Свидетельства снижения уровня биосинтеза белка в тканях гусениц непарного шелкопряда, обработанных oligoRIBO-11-фрагментом. Был применён ещё один подход – гистологические исследования (Рисунок 17), чтобы подтвердить, что oligoRIBO-11-фрагмент специфически вызвал блокирование процессов синтеза белка в клетках непарного шелкопряда путём деградации целевой 5,8S рРНК. На 6-е сутки после обработки oligoRIBO-11-фрагментом гистологические срезы гусениц непарного шелкопряда были изучены под световым микроскопом. Наиболее выраженные дистрофические изменения наблюдались в покровах насекомых, мышечных пучках и средней кишке гусениц.

По сравнению с контролем покровный эпителий гусениц непарного шелкопряда группы "oligoRIBO-11" имел признаки снижения функциональной активности и зрелости. Это проявлялось достоверным увеличением ядерно-цитоплазматического соотношения (за счет увеличения площади ядра и уменьшения площади цитоплазмы), что характерно для клеток низкой степени дифференцировки (в группе контроля соотношение составило $0,28 \pm 0,05$, а в группе "oligoRIBO-11" – $0,42 \pm 0,06$; $n=6$; $p < 0,01$). Наибольшие изменения наблюдались в ядрах, где увеличивается количество гетерохроматина. Гетерохроматин конденсировался крупными глыбками вдоль кариолеммы, уменьшилось число и размер ядрышек по сравнению с контролем (Рисунок 17; П1, а; П2, а). Данные проявления характеризуют снижение синтетической активности клеток.

Мышечные пучки гусениц непарного шелкопряда группы "oligoRIBO-11" при специальном окрашивании (конго красный) продемонстрировали выраженные признаки метаболических изменений по типу белковой дистрофии. Выявлено нарушение хода мышечных волокон, потеря поперечной исчерченности, разволокнение пучков на всем протяжении (Рисунок 17; М1, б; М2, б, в) по сравнению с контролем. На всех препаратах выявлены диффузные отложения белка. Они имеют вид структур различной формы и размеров, расположенных группами и нерегулярно в структуре групп мышечных волокон на всем их протяжении (Рисунок 17; М2, г).

Кроме этого, были обнаружены изменения в структуре клеток эпителия средней кишки гусениц насекомого группы "oligoRIBO-11" по сравнению с контролем. Высота ворсинок столбчатых клеток средней кишки была заметно ниже, чем в контроле. Значительно возросло количество бокаловидных клеток, что может являться проявлением нарушения синтеза ферментов и процессов всасывания питательных веществ (Рисунок 17; К1, д, е; К2, д, е).

Таким образом, наблюдаемые изменения в покрове насекомых, мышечных пучках и срединной части насекомых, обработанных oligoRIBO-11-

фрагментом, являются признаками дистрофии, вызванной обширным блокированием синтеза белка. Можно говорить о том, что oligoRIBO-11-инсектицид способен дополнить действие oligoRING-инсектицида там, где эффективность последнего окажется недостаточной.

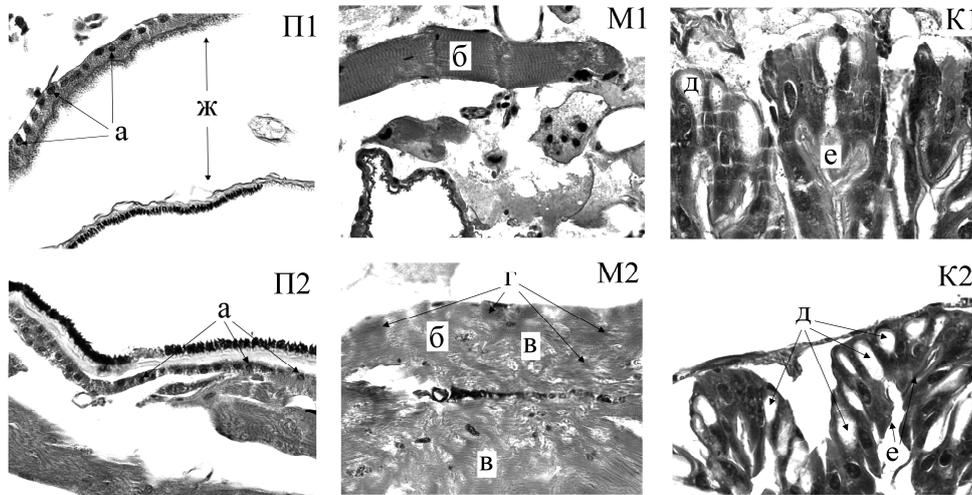


Рисунок 17 – Световая микроскопия гистологических срезов гусениц непарного шелкопряда через покровы насекомых (П), мышечный пучок (М) и среднюю кишку (К). П1, М1, К1 – контроль (вода): а – равномерное распределение гетерохроматина, хорошо выраженные ядрышки; б – упорядоченные мышечные волокна с хорошо выраженной поперечной исчерченностью; д – бокаловидные клетки; е – высокие реснички эпителиальных клеток; ж – межкутикулярное пространство. П2, М2, К2 – гусеницы, обработанные oligoRIBO-11-фрагментом и проявляющие выраженное дистрофическое разрушение тканей: а – конденсация гетерохроматина по периферии ядра, отсутствие ядрышек; б – потеря поперечной исчерченности; в – разволокнение мышечных пучков; г – диффузное отложение белка; д – большое количество бокаловидных клеток; е – низкие реснички эпителиальных клеток

Среди протестированных на непарном шелкопряде фрагментов ДНК только целевые антисмысловой oligoRING-фрагмент и oligoRIBO-11-фрагмент вызывают глубокие специфические изменения в клетках непарного шелкопряда, которые в конечном итоге приводят к гибели насекомого. Достоверного инсектицидного действия со стороны контрольного oligoA-фрагмента, oligoCpG-фрагмента и oligoBIR-фрагмента обнаружено не было. Очевидно, что специфичность ответа клеток шелкопряда зависит от последовательности азотистых оснований в целевом одноцепочечном ДНК-фрагменте, который способен или не способен влиять на экспрессию целевых генов насекомого. Это создаёт хорошие основы для промышленного производства избирательно действующих ДНК-инсектицидов с высоким уровнем экологичности. Описанные выше исследования только с одной стороны показали возможность создания избирательных ДНК-инсектицидов: когда при использовании разных последовательностей ДНК-олигонуклеотидов только определённый антисмысловый фрагмент гена хозяина или видоспецифичного бакуловируса обладал инсектицидным эффектом для

целевого насекомого. В природных сообществах или агроценозах чаще будет иметь место другая ситуация – один ДНК-олигонуклеотид (ДНК-инсектицид) и много организмов, из которых, как правило, только один является целевым. Для это были проведены дополнительные исследования, по оценке избирательности действия ДНК-инсектицидов.

РАЗДЕЛ 7 ИЗБИРАТЕЛЬНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ДНК-ИНСЕКТИЦИДОВ НА ОСНОВЕ КОРОТКИХ АНТИСМЫСЛОВЫХ ФРАГМЕНТОВ АНТИАПОПТОЗНЫХ ГЕНОВ

Химические инсектициды, составляющие большую часть мирового рынка инсектицидов, распространяются по пищевым цепям, в которых участвуют не только целевые насекомые-вредители, но и другие участники экосистем. Также необходимо иметь в виду, что целевой вид насекомого-вредителя часто обитает вместе с сотнями нецелевых видов организмов, к регулированию плотности которых лучше не прибегать. Следовательно, 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. Исследования в этом направлении в последнее десятилетие притягивают пристальный взгляд как экологов-теоретиков, так и экологов-практиков. Для антиапоптозных генов следует отметить, что в ходе коэволюции в каждой отдельной паре взаимоотношений бакуловирус-хозяин у вируса остаются такие антиапоптозные гены, экспрессия которых наиболее эффективно задерживает развитие апоптоза клеток целевого насекомого-хозяина (Hughes et al., 2002). Таким образом, 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.

7.1 Биоразлагаемость oligoRIBO-11-фрагмента и oligoRING-фрагмента с участием тканевых дезоксирибонуклеаз. Важно отметить, что современные химические инсектициды (фосфорорганические инсектициды, карбаматы, пиретроиды, неоникотиноиды и др.) обладают биоактивными свойствами и при попадании в окружающую среду неизбежно происходит их включение в процессы биоаккумуляции и биотрансформации. В процессе биоаккумуляции происходит многократное повышение концентрации инсектицида (биомагнификация) по мере продвижения его по пищевым цепям (Ghosh et al., 2012). При этом с каждым последующим звеном пищевой цепи количество инсектицида может увеличиваться в 10-20 раз (Essumang et al., 2009). Именно поэтому не обнаруживаемые в абиотической среде инсектициды могут присутствовать в тканях живых организмов в очень значительных и биологически опасных концентрациях. ДНК-инсектициды способны разрешить проблему длительного периода полураспада химических инсектицидов, так как

во всех клетках есть дезоксирибонуклеазы, обеспечивающие деградацию нуклеиновых кислот.

В этой связи для фрагментов oligoRIBO-11-фрагмента и oligoRING-фрагмента прежде всего важно исследовать активность внутриклеточных дезоксирибонуклеаз непарного шелкопряда (как целевого организма) и дуба – основной кормовой базы непарного шелкопряда, обеспечивающим наибольшую плодовитость этого вредителя (Воронцов, 1982).

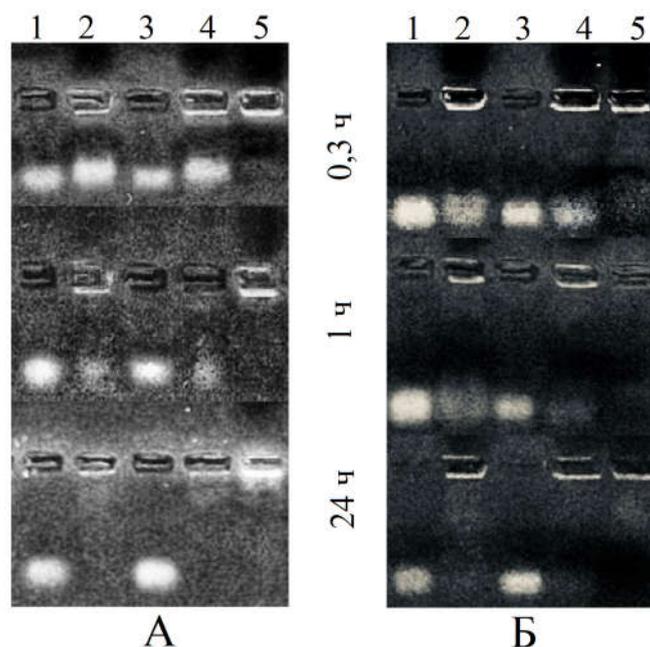


Рисунок 18 – Электрофореграмма (в 1,8%-ном агарозном геле), отображающая активность внутриклеточных дезоксирибонуклеаз непарного шелкопряда *L. dispar* (А) и дуба пушистого *Quercus pubescens* Willd. (Б) после 0,3, 1 и 24 часов при 27 °С: 1 – контроль (10 мкл oligoRIBO-11-фрагмента в концентрации 150 пмоль/мкл); 2 – гомогенат ткани (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды) + 10 мкл oligoRIBO-11-фрагмента в концентрации 150 пмоль/мкл; 3 – контроль (10 мкл oligoRING-фрагмента в концентрации 5 пмоль/мкл); 4 – гомогенат ткани (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды) + 10 мкл oligoRING-фрагмента в концентрации 5 пмоль/мкл; 5 – гомогенат чистой ткани (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды)

Исследования показали высокую активность внутриклеточных дезоксирибонуклеаз непарного шелкопряда и дуба пушистого, которые полностью разрушили oligoRIBO-11-фрагмент и oligoRING-фрагмент за 24 часа (Рисунок 18). Хотя предполагается, что во время лесозащитных мероприятий только около 0,1% инсектицида достигнет тканей насекомых-вредителей (Pimentel, 1995), а 99,9% попадут в почву и водоёмы, во всех этих местах обитания есть организмы, которые содержат вездесущие дезоксирибонуклеазы, способные разрушить ДНК-инсектициды на основе немодифицированных олигонуклеотидов.

7.2 Нецелевые насекомые. В Таблице 3 представлены результаты контактной обработки oligoBIR-фрагментом и oligoRING-фрагментом IAP-3-гена ВЯП НШ (30 пмоль/гусеницу, по 15 пмоль каждого из фрагментов ДНК) личинок каролинского бражника *Manduca sexta* L., совки-ипсилон *Agrotis ipsilon* Hufnagel и *L. monacha*. Данные нецелевые насекомые вместе с непарным шелкопрядом относятся к отряду чешуекрылых, поэтому являются хорошими модельными объектами для тестирования узконаправленного действия видоспецифичных инсектицидов на основе ДНК. В группах эксперимента на 11-е сутки исследований не было обнаружено достоверной смертности по сравнению с контролем ($p > 0,05$). Нужно отметить, что доза применённых одноцепочечных ДНК-фрагментов на мг массы тела непарного шелкопряда в экспериментах (разделы 3-6), где был показан достоверный инсектицидный эффект, была в 0,5-17 раз меньше, чем для нецелевых насекомых. Данный факт указывает на весомый запас прочности в безопасности действия антисмысловых ДНК-олигонуклеотидов.

Таблица 3 – Количество (%) выживших на 11-е сутки гусениц нецелевых насекомых после обработки ДНК-фрагментами IAP-3-гена ВЯП НШ

	контроль	oligoA	oligoBIR+oligoRING
каролинский бражник	81,7 ± 17,6	78,3 ± 16,9	91,7 ± 7,1
совка-ипсилон	77,7 ± 7,9	79,3 ± 5,8	74,7 ± 16,4
шелкопряд-монашенка	72,3 ± 11,6	66,7 ± 8,3	83,7 ± 10,9

Дополнительно было изучено накопление биомассы гусеницами нецелевых насекомых после обработки ДНК-олигонуклеотидами (Таблица 4). Достоверных различий в накоплении биомассы в группах эксперимента по сравнению с контролем обнаружено не было для $p > 0,05$.

Таблица 4 – Средняя масса (в мг) гусениц нецелевых насекомых на 11-е сутки после обработки ДНК-фрагментами IAP-3-гена ВЯП НШ

	контроль	oligoA	oligoBIR+oligoRING
каролинский бражник	294,3 ± 124,7	300,7 ± 137,5	271,1 ± 107,2
совка-ипсилон	170,3 ± 15,6	158,4 ± 5,7	150,1 ± 5,1
шелкопряд-монашенка	12,4 ± 1,7	13,1 ± 2,3	11,7 ± 1,9

В группе "oligoBIR+oligoRING" биомасса гусениц каролинского бражника, совки-ипсилон и шелкопряда-монашенки была недостоверно меньше ($p > 0,05$) по сравнению с контролем (на 7,9%, 11,8% и 9,4% соответственно) и может быть следствием слабых неспецифических реакций со стороны клетки на применённые фрагменты ДНК. Известно, что продукты разрушения ДНК-фрагментов (2'-дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфаты) способны оказывать кратковременный и относительно слабовыраженный антипрофелиративный эффект (Vaerman et al., 1997).

Была также изучена избирательность действия ДНК-инсектицида на основе oligoBIR- (5'-ACCCATAGAGTTGGCAAT-3') и oligoRING-фрагмента

(5'-CGACATGACCGCAAGGTA-3') антиапоптозного IAP-3-гена вируса ядерного полиэдроза металлоидки серой (ВЯП МС). Применённые в концентрации 30 пмоль/насекомое ДНК-фрагменты оказались безопасными для имаго амбарного долгоносика *Sitophilus granarius* L. и гусениц *A. ipsilon* 2-го возраста.

Для oligoRING-фрагмента (в отдельности без oligoBIR-фрагмента) в течение 11 суток была показана избирательность в действии (отсутствие инсектицидного эффекта) на личинках *Cydalima perspectalis* Walker со средней массой $145,1 \pm 1,7$ мг при использовании 30 пмоль/гусеницу ($p > 0,05$) и личинках колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say со средней массой $30,6 \pm 2,1$ мг при использовании 10 пмоль/личинку ($p > 0,05$).

Таким образом, ДНК-инсектицидная активность олигонуклеотидов в подавляющем большинстве случаев проведённых экспериментов была избирательной в действии и не проявляла серьёзного негативного эффекта на нецелевых насекомых. В отличие от химических инсектицидов, ДНК-инсектициды не накапливаются в тканях целевых и нецелевых организмов. Будучи эффективными против конкретного насекомого-вредителя, они реализуют принцип высокоизбирательных инсектицидов, являющихся острой необходимостью для сельского и лесного хозяйства сегодня.

7.3 Нецелевые растения. Современная концепция применения инсектицидов, опирающаяся на всесторонний экотоксикологический мониторинг, предусматривает отсутствие вреда со стороны применяемых инсектицидов не только для нецелевых животных, но и для самих растений. Известно, что химические инсектициды и химикаты снижают такие биохимические показатели, как содержание глюкозы (Habiba et al., 1992) и активность щелочной фосфатазы (Mishra, Dubey, 2008). В этой связи оценено негативное влияние oligoRING-инсектицида на дубе черешчатом *Quercus robur* L. и яблоне домашней *Malus domestica* Borkh. как одних из наиболее часто повреждаемых непарным шелкопрядом растений.

Из представленных на Рисунке 19 данных видно, что через сутки после обработки ДНК-олигонуклеотидами проростков яблони домашней было зафиксировано достоверное снижение активности щелочной фосфатазы в группе "oligoRING" ($p < 0,05$). На 7-е сутки эксперимента активность щелочной фосфатазы в группе "oligoRING" по сравнению с контролем стала недостоверной ($p > 0,05$). Таким образом, oligoRING-инсектицид не оказал длительного негативного влияния на активность щелочной фосфатазы в листьях дуба и проростках яблони домашней по сравнению с химическими инсектицидами (Mishra, Dubey, 2008). Сходные результаты были получены при изучении динамики изменения содержания глюкозы (понижение показателя на $28,5 \pm 3,6\%$ через сутки ($p < 0,05$) и его выравнивание по сравнению с контролем через 7 суток) в листьях дуба черешчатого.

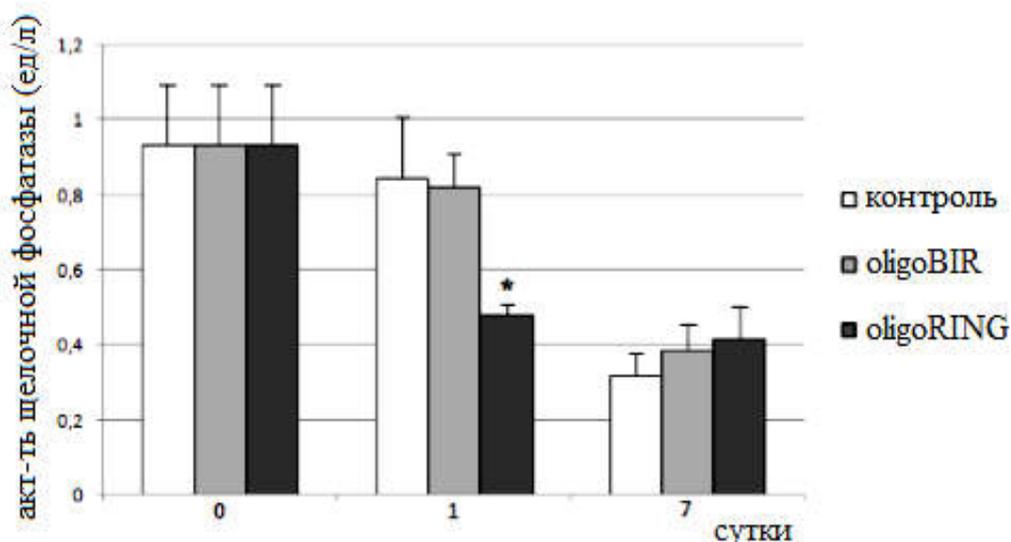


Рисунок 19 – Динамика изменения активности щелочной фосфатазы (ммоль/л) в проростках яблони домашней, обработанных ДНК-олигонуклеотидами в концентрации 5 пмоль/см². Снижение активности щелочной фосфатазы в листьях группы "oligoRING" против контроля обозначено * при $p < 0,05$

Было также исследовано влияние oligoRING-фрагмента на накопление сухой биомассы проростками пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L. Из представленных на Рисунке 20 данных видно, что на 7-е и 21-е сутки не было зафиксировано различия в накоплении сухой биомассы растениями из опытных и контрольной группы ($p > 0,05$). Нужно отметить, что попадание ДНК-фрагментов на растения можно воспринимать как природное явление. 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, возможно, что некоторые растения могут использовать свою частично деградированную геномную ДНК в качестве природных ДНК-инсектицидов.

Для оценки возможного негативного воздействия oligoRING-инсектицида на экспрессию важных для жизни растений генов, была исследована экспрессия гена фермента рибозубифосфаткарбоксилазы/оксигеназы (РуБисКО) в листьях картофеля *Solanum tuberosum* L. на 14-е сутки после обработки ДНК-олигонуклеотидами (5 пмоль/см²). OligoRING-фрагмент вызвал в $2,1 \pm 0,6$ раз более высокую экспрессию данного гена по сравнению с контролем. Однако увеличение экспрессии оказалось недостоверным по сравнению с контролем ($p > 0,05$). Сходную тенденцию показал фрагмент oligoA. РуБисКО составляет около 30% всего белка растений (Parry et al., 2003) и является самым распространённым ферментом на планете (Якушкина, 1980), катализирующим в фотосинтезе включение диоксида углерода в биологический круговорот, а также участвующий в фотодыхании (Feller et al., 2008). Таким образом, отсутствие угнетения экспрессии гена РуБисКО в группе "oligoRING" по сравнению с контролем является ещё одним доказательством безопасности oligoRING-инсектицида для нецелевых растений. Нужно отметить, что именно

увеличение содержания РубисКО в листьях приводит к более высокому уровню ассимиляции CO_2 во время фотосинтеза, что имеет важное агрономическое значение с точки зрения увеличения продуктивности растений (Parry et al., 2003). Применение ДНК-олигонуклеотидов, которые одновременно будут обладать инсектицидным эффектом на целевое насекомое, а также улучшать биологические показатели культивируемых растений, является сегодня перспективным направлением исследований.

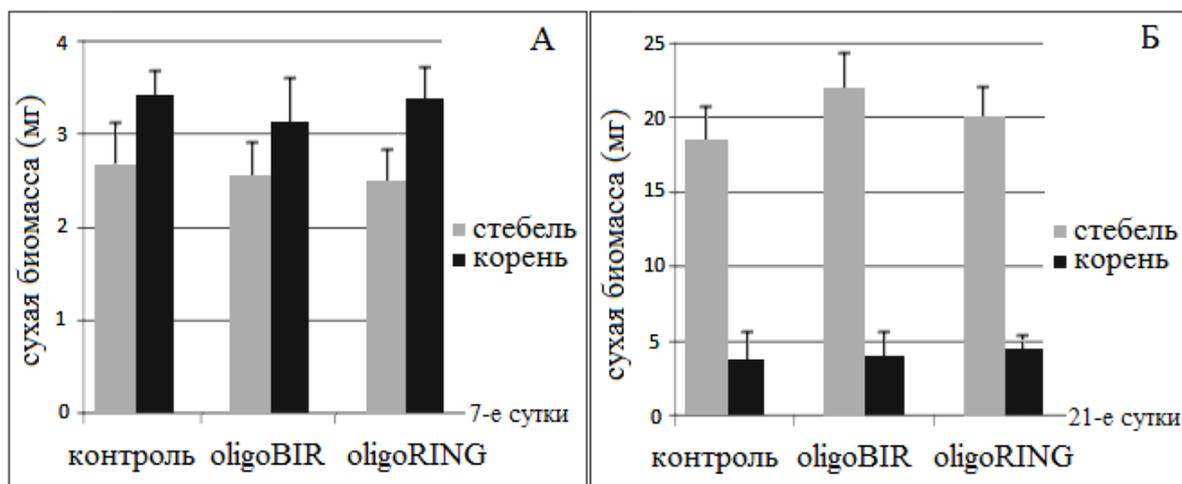


Рисунок 20 – Средняя сухая биомасса в мг стебля и корня проростков *T. aestivum* в разных группах эксперимента на 7-е (А) и 21-е (Б) сутки. Зёрна пшеницы были замочены в растворах с ДНК-олигонуклеотидами в концентрации 100 пмоль/мл в течение 2-х суток, после этого проростки перенесли на среду Хогланда

Было продемонстрировано успешное управление синтезом вторичных метаболитов растениями на примере снижения уровня образования ментола в мяте перечной *Mentha piperita* L. при помощи антисмыслового фрагмента oligoMEP-11 (5'-АСАСТСТТТТГ-3'), комплементарного мРНК гена ментонредуктазы, катализирующей превращение ментона в ментол (Рисунок 21). Содержание ментола было в 2,03 раза меньше в группе "oligoMEP-11" по сравнению с контролем ($13,12 \pm 1,64\%$ против $6,47 \pm 1,04\%$ соответственно). Обнаруженное снижение содержания ментола сопровождалось достоверным повышением содержания ментона по сравнению с контролем ($61,2 \pm 1,31\%$ против $53,5 \pm 1,74\%$ соответственно). Контрольный фрагмент oligoYM-11 (5'-АСАСТСТТТТГ-3') не оказал аналогичного действия на растение. В каждой группе эксперимента было получено одинаковое количество эфирного масла, которое находилось в пределах $0,5 \pm 0,004$ мл на 100 г листьев. Таким образом, применённые ДНК-олигонуклеотиды не оказали влияние на накопление эфирного масла, а только на его состав. Обнаруженное явление может найти самое широкое применение в сельском хозяйстве при выращивании эфиромасличных и лекарственных культур. ДНК-регуляторы накопления вторичных метаболитов могут применяться самостоятельно или быть добавлены к формуле видоспецифичных ДНК-инсектицидов.

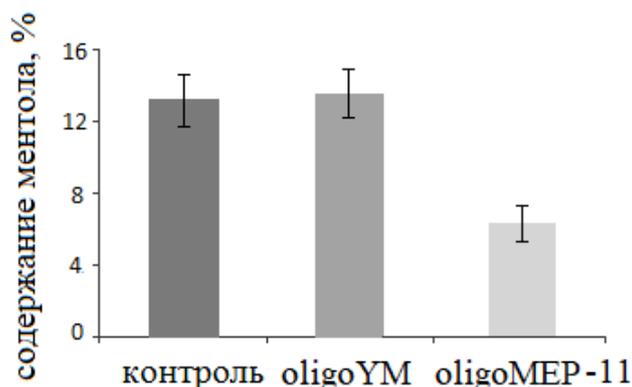


Рисунок 21 – Содержание ментола (в %) в масле листьев мяты перечной, контактно обработанных ДНК-олигонуклеотидами в концентрации 50 пмоль/см². Анализ состава масла был проведён через 4 суток после обработки

7.4 Стволовые клетки быка домашнего. С целью оценки цитотоксичности oligoRING-фрагмента для позвоночных животных были проведены исследования на мезенхимальных стволовых клетках костного мозга быка домашнего *Bos taurus taurus* L.

В трансфицированных при помощи Lipofectamine® (Invitrogen, США) мезенхимальных стволовых клетках быка домашнего антисмысловой фрагмент ДНК 5'-CTCCAGATCCCAACACC-3' антиапоптозного гена IAP-2 *Bos taurus taurus* в концентрации 1 фемтомоль/клетку вызвал достоверное увеличение доли погибших клеток через 12 суток после трансфекции: $5,92 \pm 0,18\%$ в группе oligoIAP-2 против $1,39 \pm 0,09\%$ в контроле ($p < 0,05$) (Рисунок 22).

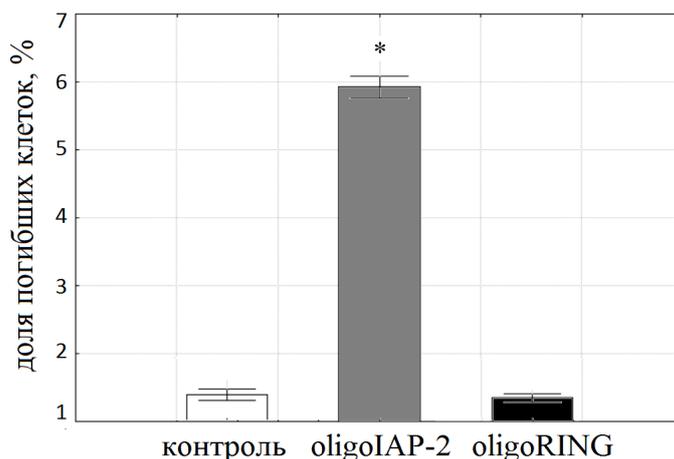


Рисунок 22 – Доля погибших стволовых клеток быка домашнего на 12-е сутки после трансфекции с oligoIAP-2-фрагментом и oligoRING-фрагментом. Окрашивание проводили реактивом Хёкста 33342 (все клетки) против иодида пропидия (погибшие клетки). Регистрацию сигналов осуществляли в клеточном сортере Sony SH800 Z (Sony Biotechnology Inc., Япония). Достоверное увеличение доли погибших клеток в группе "oligoIAP-2" обозначено * при $p < 0,01$

Напротив, контрольный антисмысловой фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ (oligoRING-инсектицид) такого эффекта не показал: $1,35 \pm 0,07\%$ погибших клеток в группе "oligoRING" против $1,39 \pm 0,09\%$ в контроле ($p > 0,05$). Полученные результаты на примере мезенхимальных стволовых клеток указывают на безопасность антисмыслового oligoRING-инсектицида для позвоночных животных.

Таким образом, oligoRING-инсектицид, разработанный для контроля численности непарного шелкопряда, не оказывает существенного негативного влияния на нецелевые организмы. Антисмысловой oligoRING-фрагмент вместе с антисмысловой oligoRIBO-11-последовательностью, избирательность действия которой была показана ранее (Walker et al., 1990), открывают возможность создания ДНК-инсектицидов с высоким уровнем экологичности. Подобрав специфическую комбинацию азотистых оснований, можно создавать видоспецифичные ДНК-инсектициды и выводить из строя какой-либо функционально важный ген у отдельного вида насекомого-вредителя по механизму действия антисмысловых олигонуклеотидов без существенного вреда для других членов экосистемы. ДНК-инсектициды, в отличие от предыдущих поколений химических инсектицидов, обладают новым прогрессивным качеством, заключающемся в универсальности общего принципа разработки препарата и зависящего от последовательностей генов целевых насекомых-вредителей.

Подводя итог диссертационной работы, нужно отметить, что все биологические компоненты экосистем (продуценты, консументы, редуценты) связаны между собой большим количеством экологических связей. Вовлекаемые в трофические цепи химические инсектициды становятся более подвижными, выходят за район первичного применения, биоконцентрируются и биотрансформируются, в некоторых случаях формируя более токсичные вещества. Кроме этого, проникновение в глубокие слои почвы пестицидов приводит к загрязнению грунтовых вод. Так как большинство современных химических инсектицидов имеют сравнительно длительный период полураспада, то происходит прирост концентрации целевого химического агента в экосистеме при переходе от низкого к более высокому трофическому уровню. В результате применения стойких химических инсектицидов в сельском и лесном хозяйстве будет всегда иметь место отравление ими участников трофических уровней водных и наземных экосистем, где для большинства химических агентов (ксенобиотиков) нет ферментов, которые способны катализировать их быстрое разложение. Таким образом, единственным безопасным способом контроля численности листогрызущих насекомых является применение природных молекул, способных быть безопасными и эффективными одновременно. На данный момент известно, что только нуклеиновые кислоты, РНК и ДНК, используя определённые комбинации азотистых оснований, способны избирательно управлять метаболизмом клеток целевых насекомых-вредителей.

Рассматриваемые в данной работе ДНК-инсектициды обладают высоким уровнем экологичности по той причине, что на каждом трофическом уровне у целевых и нецелевых организмов имеются ферменты дезоксириборибонуклеазы (ДНКазы), осуществляющие быстрый (в течение суток) распад ДНК-инсектицидов в клетках. По сути, ДНК-инсектициды регулируют поступление вещества и энергии от продуцентов к человеку, минуя целевых насекомых-вредителей, с целью получения прироста урожая в сельском и лесном хозяйстве. Вещество, поступающее от продуцентов к человеку, содержит прежде всего углеводы, белки, жиры и нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК). А на насекомое при этом попадает количество ДНК-инсектицида равное 0,1-0,2% его собственной ДНК. Таким образом, внося в экосистему толику ДНК в качестве ДНК-инсектицидов, мы, образно говоря, вносим каплю чистой воды в океан (Рисунок 23).

Разработки РНК-препаратов на основе двухцепочечных молекул, на которых сконцентрированы западные учёные, могут быть дополнены результатами исследований по ДНК-инсектицидам с целью создания первого готового препарата. В частности, контактный способ доставки ДНК-инсектицидов, а также небольшой размер применяемых ДНК-фрагментов могут сделать РНК-препараты более доступными и избирательными в действии. Кроме этого, в большинстве случаев количество двухцепочечной РНК, необходимой для достижения РНК-интерференции, варьируется между 1 и 100 мкг на насекомое (Terenius et al., 2011). Для сравнения, в опытах с ДНК-инсектицидами контактным путём используется 3-30 пмоль антисмысловых ДНК длиной 11-20 нуклеотидов на одну гусеницу непарного шелкопряда I-II возрастов, что соответствует приблизительно 1,8-180 нг ДНК на гусеницу насекомого (в среднем масса шелкопряда находилась в пределах 1-10 мг). Таким образом, РНК-препараты уступают ДНК-инсектицидам в доступности, так как проявляют инсектицидную активность в значительно более высоких концентрациях. Кроме этого, синтез одноцепочечных фрагментов ДНК на данный момент приблизительно на порядок дешевле, чем синтез РНК-фрагментов. Нужно также отметить, что технологии синтеза и очистки ДНК-олигонуклеотидов становятся всё менее затратными, что уже сегодня позволяет говорить о перспективности ДНК-инсектицидов.

Современное состояние агроценозов требует расширения возможностей их стабилизации путём создания и использования инсектицидных препаратов нового поколения, связанных с биологизацией самих приёмов защиты от вредителей и понимания экологического равновесия. В этой связи ДНК-препараты являются перспективной разработкой, действующим и метаболизирующимся по созданным природой молекулярным механизмам, которые способны снизить в экосистемах концентрацию современных химических инсектицидов – органических ксенобиотиков. Применение коротких антисмысловых фрагментов из консервативных частей генов насекомых-вредителей открывает возможность использования данного подхода в антирезистентных программах, а также создавать ДНК-инсектициды по

универсальному механизму, меняя лишь комбинацию азотистых оснований в зависимости от генных последовательностей целевого насекомого-вредителя. Очевидно, что будет невозможным применение контактных ДНК-инсектицидов против некоторых групп насекомых, в частности имаго жуков, потому что массивные надкрылья могут обеспечить надёжную защиту от контакта с препаратом. Вместе с тем ДНК-инсектициды выглядят подходящим видоспецифичным инструментом контроля численности большинства чешуекрылых-вредителей, которые не ведут скрытный образ жизни на стадии младших личиночных возрастов. На примере ДНК-инсектицидов можно говорить о том, что антисмысловые олигонуклеотиды способны играть важную роль регулятора функционирования экосистем и постепенно раскрывают свой потенциал эффективного и безопасного управления ими в целях народного хозяйства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведённых исследований показана эффективность и высокий уровень экологичности контактного применения коротких антисмысловых ДНК-олигонуклеотидов (ДНК-инсектицидов) в качестве агентов повышения смертности целевых насекомых-вредителей путём их негативного влияния на клеточные механизмы клеток целевых насекомых-вредителей. ДНК-инсектициды могут применяться самостоятельно для контроля численности листогрызущих насекомых или совместно с бакуловирусными препаратами.

1. Однократное контактное применение антисмыслового oligoRING-фрагмента антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ в концентрации 3-30 пмоль/личинку на безвирусных гусеницах *Lymantria dispar* младших возрастов приводит к глубоким изменениям в организме насекомого (увеличение смертности, снижение биомассы, увеличение содержания кальция и магния в тканях, конденсация и фрагментация ядерного материала, уменьшение объёма клеток), которые сопровождают его до следующей генерации (яйца насекомого) включительно. Более яркий эффект действия ДНК-инсектицида наблюдается на безвирусных гусеницах, собранных в природе, чем выращенных из яиц насекомого в лаборатории.

2. Антисмысловой oligoRIBO-11-фрагмент гена, кодирующего 5,8S рРНК, в концентрации 6 пмоль/личинку повышает смертность гусениц младших возрастов *L. dispar*, устойчивых к oligoRING-инсектициду.

3. Инсектицидный эффект достигается при использовании контактным путём 1,8-180 нг целевого одноцепочечного ДНК-фрагмента на 1 мг биомассы личинки насекомого. ДНК-инсектициды действуют в значительно более низких концентрациях по сравнению с РНК-препаратами (1-100 мкг на 1-10 мг биомассы) и являются более доступными.

4. Зафиксирован инсектицидный эффект при использовании коротких одноцепочечных фрагментов антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП МС на

гусеницах *Trichoplusia ni* и антиапоптозного IAP-1-гена *Culex pipiens* с использованием био-прилипателя "Липосам" на его личинках.

5. В безвирусных клетках *L. dispar* имеется целевая мРНК антиапоптозного IAP-Z-гена, пригодная для создания ДНК-инсектицидов, которая обладает высокой степенью схожести с антиапоптозным IAP-3-геном ВЯП НШ и имеет комплементарный oligoRING-фрагменту участок.

6. Контактная обработка личинок *L. dispar* антисмысловым oligoRING-фрагментом IAP-Z-гена и личинок *Drosophila melanogaster* антисмысловым oligoDIAP-2(-)-фрагментом DIAP-2-гена приводит к более высокой частоте формирования морфологических самцов.

7. При контактном применении антисмыслового oligoRING-фрагмента антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ на безвирусных гусеницах *L. dispar* снижается экспрессия целевого антиапоптозного IAP-Z-гена. При контактном применении антисмыслового oligoRIBO-11-фрагмента из гена, кодирующего 5,8S рРНК, на безвирусных гусеницах *L. dispar* снижается концентрация целевой 5,8S рРНК. При контактном применении антисмыслового oligoRING-2(-)-фрагмента антиапоптозного DIAP-2-гена на личинках *D. melanogaster* также снижается экспрессия целевого антиапоптозного гена.

8. Однократное контактное применение антисмыслового oligoRING-фрагмента антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ в концентрации 3-30 пмоль/личинку на заражённых ВЯП НШ в природе и лаборатории гусеницах *L. dispar* младших возрастов приводит к повышенной смертности насекомого, уменьшению его биомассы и снижению суммарной экспрессии хозяйского антиапоптозного IAP-Z-гена и бакуловирусного IAP-3-гена.

9. OligoRING-фрагмент вызывает повышенную смертность заражённых в лаборатории ВЯП НШ близкородственных *L. dispar* гусениц *Lymantria monacha* из отряда чешуекрылых. Напротив, не было обнаружено существенной смертности заражённых ВЯП НШ и обработанных oligoRING-фрагментом личинок *Leptinotarsa decemlineata* и *D. melanogaster* из отрядов жёсткокрылых и двукрылых.

10. На безвирусных и заражённых ВЯП НШ гусеницах *L. dispar* методом анализа микросрезов тканей, детекции апоптотической "ДНК-лестницы" и анализа изменения концентрации целевых РНК хозяина показано, что основными специфическими механизмами, обуславливающими гибель клеток насекомого, является апоптоз в случае oligoRING-фрагмента и снижение уровня биосинтеза белка в случае oligoRIBO-11-фрагмента.

11. Контактная обработка растений *Mentha piperita* антисмысловым ДНК-фрагментом oligoMER-11, комплементарного к мРНК ментонредуктазы, в концентрации 50 пмоль/см² приводит к снижению содержания ментола и увеличению содержания ментона. ДНК-регуляторы накопления вторичных метаболитов растениями могут быть добавлены к формуле ДНК-инсектицидов, а также применяться самостоятельно.

12. Среди протестированных фрагментов ДНК (основные – "oligoRING", "oligoRIBO-11", "oligoA", "oligoCpG", "oligoBIR", "oligoHB") только

антисмысловые 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 жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга *Bos taurus taurus*, на смертность и накопление биомассы нецелевых насекомых (*Manduca sexta*, *Agrotis ipsilon*, *L. monacha*, *Cydalima perspectalis*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Galleria mellonella*), на угнетение экспрессии гена рибулозобифосфаткарбоксилазы *Solanum tuberosum*, биохимические показатели *Quercus robur* и *Malus domestica* (содержание глюкозы и активность щелочной фосфатазы) и накопление биомассы *Triticum aestivum*, а также в течение суток полностью деградируются дезоксирибонуклеазами *L. dispar* и *Quercus pubescens*, не накапливаясь в тканях.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Проведённые лабораторные и полевые эксперименты легли в основу практических рекомендаций по применению ДНК-инсектицидов для контроля численности непарного шелкопряда в лиственных лесах.

Контактные oligoRING-инсектицид и oligoRIBO-11-инсектицид рекомендуется использовать в лесу для контроля численности безвирусного непарного шелкопряда днём (с 11-12 до 15-16 часов) в сухую и безветренную погоду при температуре 20-27 °С. Обработку следует проводить, когда основная часть популяции вредителя (60-70%) находится на I-II личиночном возрасте. На одно лиственное дерево высотой 2-3 метра рекомендуется использовать 6-7 мг oligoRING-инсектицида и 3,5-4 мг oligoRIBO-11-инсектицида. Для обработок следует использовать водный раствор ДНК-инсектицидов из расчёта 200-300 мл на дерево.

OligoRING-инсектицид может быть использован для повышения эффективности действия бакуловирусных препаратов. Для этого через 2 суток после обработки бакуловирусным препаратом необходимо провести обработку oligoRING-инсектицидом в концентрации 6-7 мг препарата, растворённого в 200-300 мл дистиллированной воды, на лиственное дерево высотой 2-3 метра. Обработку бакуловирусным препаратом нужно провести так, чтобы за 2 суток в гусеницу I-II личиночного возраста попало не менее 400-500 вирусных полиэдров. OligoRING-инсектицид рекомендуется использовать в лесу для контроля численности непарного шелкопряда днём (с 11-12 до 15-16 часов) в сухую и безветренную погоду при температуре 20-27 °С. Обработку следует проводить, когда основная часть популяции вредителя (60-70%) находится на I-II личиночном возрасте. Возможно применение oligoRING-инсектицида без предварительного заражения насекомого бакуловирусом, если вирус уже циркулирует в популяции вредителя и заметна значительная гибель от

бакуловирусной инфекции не менее 2-5% гусениц I-II возрастов непарного шелкопряда за 2-4 дня.

Обработку oligoRING-инсектицидом и oligoRIBO-11-инсектицидом рекомендуется проводить при использовании ранцевого опрыскивателя или генератора холодного тумана с размером капли 10-20 мкм, меняя угол атаки так, чтобы препарат попал на всю листовую поверхность деревьев с находящимися на них гусеницами непарного шелкопряда. При наличии 400-500 деревьев на гектар леса будет достаточно 3-4 г oligoRING-инсектицида, растворённых в 130-140 литрах дистиллированной воды. В случае oligoRIBO-11-инсектицида будет достаточно 1,6-1,8 г вещества растворённого в 130-140 литрах дистиллированной воды. При обработках рекомендуется избегать попадания препарата с воздухом в лёгкие, используя противопылевые (противоаэрозольные) респираторы, и глаза, используя защитные очки, так как очень тонкие детали возможного неспецифического действия ДНК-инсектицидов изучены недостаточно. Кратность обработок зависит от динамики отрождения гусениц и возможно от 1 до 3 обработок.

ДНК-инсектициды рекомендуется после синтеза лиофилизировать и хранить в полипропиленовых ёмкостях в сухом прохладном месте при комнатной температуре вдали от солнечных лучей или в холодильнике при 5-8 °С. Раствор с ДНК-инсектицидом следует приготовить непосредственно перед обработкой деревьев. Отсутствие разрушения активного вещества препарата можно оценить методом электрофореза нуклеиновых кислот с использованием соответствующего свежеприготовленного эталона oligoRING-инсектицида или oligoRIBO-11-инсектицида в 3-4%-ном агарозном геле. Синтез ДНК-инсектицидов (как и любых других олигонуклеотидов, используемых для молекулярно-генетических исследований) возможен амидофосфитным путём на ДНК-синтезаторах типа ASM-800 (БИОССЕТ, Россия) и др.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

а) в изданиях из базы данных Scopus:

1. Oberemok, V.V. Single-stranded DNA fragments of insect-specific nuclear polyhedrosis virus act as selective DNA insecticides for gypsy moth control / Oberemok V.V., Skorokhod O.A. // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. – 2014. – V. – 113. – P. 1-7.

2. Oberemok, V.V. DNA insecticides based on iap3 gene fragments of cabbage looper and gypsy moth nuclear polyhedrosis viruses show selectivity for non-target insects / Oberemok V.V., Laikova K.V., Zaitsev A.S., Nyadar P.M., Shumskykh M.N., Gninenko Yu.I. // *Archives of Biological Sciences*. – 2015. – V. 67(3). – P. 785-792.

3. Oberemok, V.V. Investigation of mode of action of DNA insecticides on the basis of LdMNPV IAP-3 gene / Oberemok V.V., Nyadar P.M. // *Turkish Journal of Biology*. – 2015. – V. 39. – P. 258-264.

4. Oberemok, V.V. Influence of DNA oligonucleotides used as insecticides on biochemical parameters of *Quercus robur* and *Malus domestica* / Zaitsev A.S., Omel'chenko O.V., Nyadar P.M., Oberemok V.V. // Bulletin of Transilvanian University of Braşov. – 2015. – V. 8. – P. 37-46.
5. Oberemok, V.V. A brief review of most widely used modern insecticides and prospects for the creation of DNA insecticides / Oberemok V.V., Zaitsev A.S., Levchenko N.N., Nyadar P.M. // Entomological Review. – 2015. – V. 95 (7). – P. 824-831.
6. Oberemok, V.V. A short history of insecticides / Oberemok V.V., Laikova K.V., Gninenko Y.I., Zaitsev A.S., Nyadar P.M., Adeyemi T.A. // Journal of Plant Protection Research. – 2015. – V. 55 (3). – P. 221-226.
7. Oberemok, V.V. The RING for gypsy moth control: topical application of fragment of its nuclear polyhedrosis virus antiapoptosis gene as insecticide / Oberemok V.V., Laikova K.V., Zaitsev A.S., Gushchin V.A., Skorokhod O.A. // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2016. – V. 131. – P. 32-39.
8. Oberemok, V.V. Data for increase of *Lymantria dispar* male survival after topical application of single-stranded RING domain fragment of IAP-3 gene of its nuclear polyhedrosis virus / Oberemok V.V., Laikova K.V., Zaitsev A.S., Gushchin V.A., Skorokhod O.A. // Data in Brief. – 2016. – V. 7. – P. 514-517.
9. Oberemok, V.V. Biological control of gypsy moth (*Lymantria dispar*): an RNAi-based approach and a case for DNA insecticides / Nyadar P.M., Zaitsev A.S., Adeyemi T.A., Shumskykh M.N., Oberemok V.V. // Archives of Biological Sciences. – 2016. – V. 68 (3). – P. 677-683.
10. Oberemok, V.V. Molecular alliance of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus and short unmodified antisense oligonucleotide of its anti-apoptotic IAP-3 gene: a novel approach for gypsy moth control / Oberemok V.V., Laikova K.V., Zaitsev A.S., Shumskykh M.N., Kasich I.N., Gal'chinsky N.V., Bekirova V.V., Gushchin V.A., Makarov V.V., Agranovsky A.A., Zubarev I.V., Kubyshkin A.V., Fomochkina I.I., Gorlov M.V., Skorokhod O.A. // International Journal of Molecular Sciences – 2017. – V. 18(11), 2446.
11. Oberemok, V.V. The need for the application of modern chemical insecticides and environmental consequences of their use: a mini review / Oberemok V.V., Laikova K.V., Zaitsev A.S., Temirova Z.Z., Gal'chinsky N.V., Nyadar P.M., Shumskykh M.N., Zubarev I.V. // Journal of Plant Protection Research. – 2017. – V. 57(4). – P. 427-432.
12. Oberemok, V.V. Topical treatment of LdMNPV-infected gypsy moth caterpillars with 18 nucleotides long antisense fragment from LdMNPV IAP-3 gene triggers higher level of apoptosis in the infected cells and mortality of the pest / Oberemok V.V., Laikova K.V., Zaitsev A.S., Nyadar P.M., Gninenko Yu. I., Gushchin V.A., Makarov V.V., Agranovsky A.A. // Journal of Plant Protection Research. – 2017. – V. 57 (1). – P. 18-24.
13. Oberemok, V.V. DNA insecticides: the effect of concentration on non-target plant organism such as wheat (*Triticum aestivum* L.) / Nyadar P., Oberemok V., Omelchenko A., Kerimova S., Seidosmanova E., Krasnodubets A., Shumskykh

M., Bekirova V., Galchinsky N., Vvedensky V. // Journal of Plant Protection Research. – 2019. – V. 59(1). – 60-68.

14. Oberemok, V.V. A half-century history of applications of antisense oligonucleotides in medicine, agriculture and forestry: we should continue the journey / Oberemok V.V., Laikova K.V., Repetskaya A.I., Kenyo I.M., Gorlov M.V., Kasich I.N., Krasnodubets A.M., Gal'chinsky N.V., Fomochkina I.I., Zaitsev A.S., Bekirova V.V., Seidosmanova E.E., Dydik K.I., Meshcheryakova A.O., Nazarov S.A., Smagliy N.N., Chelengerova E.L., Kulanova A.A., Deri K., Subbotkin M.V., Useinov R.Z., Shumskykh M.N., Kubyshkin A.V. // Molecules. – 2018. – V. 23, 1302.

15. Oberemok, V.V. DNA insecticides: data on the trial in the field / Oberemok V.V., Laikova K.V., Gal'chinsky N.V., Shumskykh M.N., Repetskaya A.I., Bessalova E.Y., Makalish T.P., Gninenko Y.I., Kharlov S.A., Ivanova R.I., Nikolaev A.I. // Data in Brief. – 2018. V. 21 – P. 1858-1860.

16. Oberemok, V.V. A small molecule for a big transformation: topical application of a 20-nucleotide-long antisense fragment of the DIAP-2 gene inhibits the development of *Drosophila melanogaster* female imagoes / Nyadar P.M., Oberemok, V.V., Zubarev I.V. // Archives of Biological Sciences. – 2018. – V. 70 (1). – P. 33-39

17. Oberemok, V.V. DNA insecticide developed from the *Lymantria dispar* 5.8S ribosomal RNA gene provides a novel biotechnology for plant protection/ Oberemok V.V., Laikova K.V., Gal'chinsky N.V., Useinov R.Z., Novikov I.A., Temirova Z.Z., Shumskykh M.N., Krasnodubets A.M., Repetskaya A.I., Dyadichev V.V., Bessalova E.Y., Makalish T.P., Gninenko Y.I., Fomochkina I.I., Kubyshkin A.V. // Scientific Reports. – 2019. – V. 9, 6197.

б) в изданиях согласно перечню ВАК:

18. Оберемок, В.В. ДНК-инсектициды против ДНК-стимуляторов: каждое лекарство есть яд, каждый яд есть лекарство / Оберемок В.В. Зайцев А.С., Симчук А.П. // Учёные записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия "Биология, химия". – 2011. – Т. 24 (63). №1. – С. 136-143.

19. Oberemok, V.V. Pioneer evaluation of the possible side effects of the DNA insecticides on wheat (*Triticum aestivum* L.) / Oberemok V.V., Nyadar P.M., Zaitsev A.S., Levchenko N.N., Shiyntum H.N., Omelchenko O. V. // International Journal of Biochemistry and Biophysics. – 2013. – V. 1. – P. 57-63.

20. Оберемок, В.В. Современные инсектициды: их преимущества, недостатки и предпосылки к созданию ДНК-инсектицидов / Оберемок В.В., Зайцев А.С. // Учёные записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия "Биология, химия". – 2014. – Т. 27 (66). №1. – С. 112-126.

21. Оберемок, В.В. Создание ДНК-инсектицидов – новое направление в защите растений / Оберемок В.В., Лайкова Е.В., Зайцев А.С., Ниадар П.М.,

Гущин В.А., Макаров В.В., Шумских М.Н., Талипова Н.Р., Гальчинский Н.В., Гниненко Ю.И. // Защита и карантин растений. – 2016. – №11. – С. 14-17.

в) главы в книгах:

22. Oberemok, V.V. Chapter 7. Genetic of interactions between moths, host plants and their enemies in Crimean oak forests and its perspective for their control / Simchuk A.P., Oberemok V.V., Ivashov A.V. // In: Moths: Types, Ecological Significance and Control Methods, ISBN 978-1-61470-647-2; Editor: Luis Cauterruccio, Nova Science Publishers, Inc. – 2012. – P. 187-205.

23. Oberemok, V.V. Current methods of gypsy moth control and perspectives of using DNA insecticides topically and through feeding / Nyadar P.M., Talipova N.R., Laikova K.V., Oberemok V.V. // In: Advances in Animal Science and Zoology. Nova Science Publishers, Inc. – 2017. – V. 10, Chapter 5. – P. 87-100.

г) патенты на изобретения:

24. Оберемок, В.В. Способ очистки вирусных полиэдров / Гниненко Ю.И., Оберемок В.В. // Патент РФ на изобретение №2570553. Заявка №2013151360, приоритет изобретения от 20 ноября 2013 г., зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 11 ноября 2015 г.

25. Оберемок, В.В. Способ повышения эффективности бакуловирусных препаратов / Оберемок В.В. // Патент на изобретение № 2581794. Заявка №2015117874, приоритет изобретения от 12 мая 2015 г., зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 8 марта 2016 г.

26. Оберемок, В.В. Способ борьбы с личинками металлоидки серой / Оберемок В.В. // Патент на изобретение № 2645258. Заявка №2016122543, приоритет изобретения от 7 июня 2016 г., зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 19 февраля 2018 г.

27. Оберемок, В.В. Способ получения препарата для регуляции численности комара обыкновенного (*Culex pipiens*) / Лайкова Е.В., Зайцев А.С., Оберемок В.В. // Патент РФ на изобретение №2664182. Заявка №2016147653, приоритет изобретения от 5 декабря 2016г., зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 15 августа 2018г.

д) тезисы конференций:

28. Оберемок В.В., Барабан Т.В., Зайцев А.С., Красильщикова С.И., Сизых Л.М. Исследование влияния одноцепочечных ДНК-фрагментов вируса ядерного полиэдроса непарного шелкопряда на жизнедеятельность *Drosophila melanogaster* // Материалы IX международной конференции студентов и аспирантов "Молодёжь и продвижение биологии". 5-7 апреля, 2011 г., Львов. – 2011. – Т.1 – С. 144-145.

29. Oberemok V., Laikova K., Krasilschikova S., Simchuk A. DNA stimulators: sense strand fragment of LdMNPV IAP-3 gene increases viability of *Drosophila melanogaster* // Proceedings of the 4th international IMBG conference for

young scientists "Molecular biology: advances and perspectives". September 14-17, 2011, Kyiv. – 2011. – P. 98.

30. Оберемок В.В. ДНК-маркеры в изучении взаимоотношений между вирусом ядерного полиэдроза и его хозяином непарным шелкопрядом // Материалы XL научной конф. профессорско-преподавательского состава, аспирантов и студентов "Дни науки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского". 21–24 апреля, 2011 г., Симферополь. – 2011. – С. 26.

31. Oberemok V., Zaytsev O., Levchenko N., Nyadar P., Shiyntum H., Omel'chenko O. The evaluation of possible side effects of the DNA insecticides on wheat (*Triticum aestivum* L.) // Proceedings of the international research and practice conference "Nanotechnology and nanomaterials". August 25 – September 1, 2013, Bukovel. – 2013. – P. 392-393.

32. Oberemok V.V., Zaytsev A.S., Nyadar P.M., Levchenko N.N., Gninenko Yu.I. DNA insecticides: preparations based on fragments of anti-apoptotic genes of nuclear polyhedrosis viruses for control of pest insects // Proceedings of the international conference "Biotechnology and quality of life". March 18-20, 2014, Moscow. – 2014. – P. 296-297.

33. Оберемок В.В. Короткий антисмысловой фрагмент антиапоптозного гена вируса ядерного полиэдроза действует как триггер к гибели непарного шелкопряда, заражённого этим вирусом // Материалы 1-й научной конференции профессорско-преподавательского состава аспирантов, студентов и молодых учёных "Дни науки Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского". 28-29 апреля, 2015 г., Симферополь. – 2015. – Т. 3. – С. 80-81.

34. Оберемок В.В., Гниненко Ю.И. ДНК-инсектициды – новый подход к регуляции численности листогрызущих насекомых // Материалы IX международной научной конференции "Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты". 7-11 сентября, 2015 г., Минск. – 2015 – С. 111-112.

35. Nyadar P., Zaitsev A., Adeyemi T., Shumskykh M., Temirova Z., Oberemok V. DNA insecticides for gypsy moth (*Lymantria dispar*) control // Proceedings of "BIT's 6th World Gene Convention". November 13-16, 2015, Qindao. – 2015. – P. 344.

36. Оберемок В.В., Зайцев А.С., Шумских М.Н., Гальчинский Н.В. ДНК-инсектициды и РНК-инсектициды: на пути к созданию новых препаратов для контроля численности чешуекрылых // Материалы Всероссийской конференции с международным участием "Мониторинг и биологические методы контроля вредителей и патогенов древесных растений: от теории к практике". 18-22 апреля, 2016 г., Москва. – 2016. – С. 159-160.

37. Зайцев А.С., Ниадар П.М., Оберемок В.В. Влияние ДНК-инсектицидов на активность щелочной фосфатазы и концентрацию глюкозы в листьях *Quercus robur* и проростках *Malus domestica* // Материалы 20-й международной Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века". 18-22 апреля, 2016 г., Пущино. – 2016. – С. 120.

38. Oberemok V.V., Laikova K.V., Tajudeen A.A., Zaitsev A.S., Shumskykh M. N., Gal'chinsky N.V., Nyadar P.M. Single-stranded DNA fragments of LdMNPV IAP-3 gene synthesized in vitro as a more efficient insecticide for gypsy moth (*Lymantria dispar*) control than RNAi approach // Proceedings of 2016 World Congress on in Vitro Biology. June 11-15, 2016, San Diego. – 2016. – A 2016 (animal poster).

39. Nyadar P., Oberemok V., Laikova K., Zaitsev A., Adeyemi T., Shumskykh M., Temirova Z., Kot F., Kot T., Meschryakova E., Gerasimenko D., Gal'chinsky N., Kenyo I.M., Reznik N.G., Skorokhod O.A. Virus before oligonucleotide-vent to apoptosis (VOVA) effect as a promising tool for more effective use of baculoviral preparations // Proceedings of 12th Euro Biotechnology Congress. November 7-9, 2016, Alicante.

40. Oberemok V., Nyadar P. Short single-stranded fragments of baculoviral single-stranded fragments of baculoviral IAP genes as the next generation insecticides and a possible tool for solving the problem of insecticides resistance // Proceedings of international symposium "Young Researchers in BioSciences". July 25-31, 2016, Cluj-Napoca. – 2016. – P. 28.

41. Nyadar P., Oberemok V. Insecticidal activity from 20-nucleotides-long antisense fragment of LdMNPV IAP-2 gene through feeding // Proceedings of international symposium "Young Researchers in BioSciences". July 25-31, 2016, Cluj-Napoca. – 2016. – P. 31.

42. Зайцев А.С., Оберемок В.В., Лайкова Е.В. Разработка ДНК-инсектицидов для контроля численности личинок *Culex pipiens* // Материалы 2-й научной конференции профессорско-преподавательского состава аспирантов, студентов и молодых учёных "Дни науки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского". 24-28 октября, 2016 г., Симферополь. – 2016. – Т. 1. – С. 80-81.

43. Оберемок В.В., Лайкова Е.В., Зайцев А.С., Шумских М.Н., Ниадар П., Гальчинский Н.В. ДНК-инсектицид на основе антисмыслового фрагмента антиапоптозного гена IAP-3 вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда вызывает апоптотические процессы в клетках хозяина // Материалы 2-й научной конференции профессорско-преподавательского состава аспирантов, студентов и молодых учёных "Дни науки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского". 24-28 октября, 2016 г., Симферополь. – 2016. – Т. 1. – С. 401-402.

44. Oberemok V.V., Laikova K.V., Nyadar P.M., Barsegan A.G., Gal'chinsky N.V., Shumskykh M.N., Nazarov S.A., Kashapova I.S., Chivilev I.V., Kornienko E.V., Arhipova A.L., Kovalchuk S.N., Kosovskiy G.Yu. Estimation of the safety of oligoRING insecticide on bone marrow cells of domestic bull *Bos taurus taurus* L.// Proceedings of 2017 In Vitro Biology Meeting. June 10-14, 2017, Raleigh. – 2017. – A 3013 (silent abstract).

45. Оберемок В.В., Лайкова Е.В., Зайцев А.С., Шумских М.Н., Гальчинский Н.В. Исследование биологических эффектов коротких одноцепочечных фрагментов антиапоптозных генов с целью создания ДНК-

инсектицидов // Материалы 3-й научной конференции профессорско-преподавательского состава аспирантов, студентов и молодых учёных "Дни науки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского". 23-27 октября, 2017 г., Симферополь. – 2017. – Т. 7. – С. 441-442.

46. Гальчинский Н.В., Назаров С.А., Оберемок В.В. Оценка доступности использования oligoRING-триггера повышения эффективности вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда // Материалы 4-й научной конференции профессорско-преподавательского состава аспирантов, студентов и молодых учёных "Дни науки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского". 10-17 октября, 2018 г., Симферополь. – 2018. – Т. 2. – С. 158-159.

47. Назаров С.А., Гальчинский Н.В., Оберемок В.В. Анализ домена RING антиапоптозного гена IAP-3 вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда для поиска наиболее консервативного участка целевого гена // Материалы 4-й научной конференции профессорско-преподавательского состава аспирантов, студентов и молодых учёных "Дни науки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского". 10-17 октября, 2018 г., Симферополь. – 2018. – Т. 2. – С. 161-162.

48. Оберемок В.В., Назаров С.А., Гальчинский Н.В. Повышение эффективности бакуловирусных препаратов при помощи антисмысловых олигонуклеотидов на примере непарного шелкопряда // Материалы 4-й научной конференции профессорско-преподавательского состава аспирантов, студентов и молодых учёных "Дни науки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского". 10-17 октября, 2018 г., Симферополь. – 2018. – Т. 2. – С. 159-160.

49. Oberemok V.V., Laikova K.V., Novikov I.A., Gal'chinsky N.V., Useinov R.Z. Controlling the accumulation of secondary metabolites by plants using antisense oligonucleotides // Proceedings of Plant Canada 2019. July 7-10, 2019, Guelph. – 2019. – S26.

50. Oberemok V.V., Laikova K.V., Novikov I.A., Gal'chinsky N.V., Useinov R.Z., Plugatar Yu.V. An antisense oligoRIBO-11 fragment (contact DNA insecticide) penetrates through the integuments into the cells of gypsy moth larvae (*Lymantria dispar* L.) // Proceedings of Plant Canada 2019. July 7-10, 2019, Guelph. – 2019. – S191.