

Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования "Крымский федеральный  
университет имени В.И. Вернадского"

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

Диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант

доктор сельскохозяйственных наук,

чл.-корр. РАН Плугатарь Юрий Владимирович

Симферополь – 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
РАЗДЕЛ 1 БИОЛОГИЯ ИНСЕКТИЦИДОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	15
1.1 Краткая история применения инсектицидов.....	15
1.2 Описание и механизм действия некоторых инсектицидов .....	21
1.3 Необходимость применения инсектицидов и причины создания новых препаратов.....	33
1.4 Вредные последствия использования химических инсектицидов для окружающей среды .....	39
1.5 Преимущества современных агентов регуляции численности насекомых как предпосылки к созданию ДНК-инсектицидов .....	41
1.6 Особенности разработки ДНК-инсектицидов с высоким уровнем экологичности.....	47
1.7 Трудности, связанные с разработкой РНК-препаратов для контроля численности чешуекрылых насекомых, и преимущества ДНК-инсектицидов.	56
1.8 Первый эксперимент по применению ДНК-инсектицидов на непарном шелкопряде .....	60
1.9 Происхождение применённых против непарного шелкопряда ДНК-инсектицидов и их связь с апоптозом.....	62
1.10 Непарный шелкопряд как листогрызущее насекомое .....	68
РАЗДЕЛ 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	71
2.1 Происхождение гусениц непарного шелкопряда и других насекомых .....	71
2.2 Выращивание насекомых в лабораторных условиях .....	72
2.3 Взвешивание насекомых .....	74
2.4 Дизайн олигонуклеотидов.....	74
2.5 Обработка насекомых ДНК-олигонуклеотидами.....	74

2.6	Заражение гусениц ВЯП НШ.....	75
2.7	Исключение и доказательство заражения непарного шелкопряда ВЯП.....	76
2.8	Выращивание растений .....	76
2.9	Взвешивание растений .....	77
2.10	Анализ содержания глюкозы и активности щелочной фосфатазы в.....	77
	растениях.....	77
2.11	Выделение, амплификация ДНК и детекция продуктов амплификации ...	78
2.12	Выделение РНК.....	81
2.13	Обратная транскрипция.....	83
2.14	Секвенирование ДНК .....	83
2.15	ПЦР в реальном времени (анализ экспрессии генов).....	84
2.16	Гистологические исследования .....	85
2.17	Детекция апоптотической "лестницы ДНК" .....	85
2.18	Измерение кальция и магния в тканях яиц насекомого.....	86
2.19	Определение количества погибших клеток в исследуемой популяции стволовых клеток быка домашнего.....	86
2.20	Анализ масла мяты перечной методом газовой хроматографии .....	88
2.21	Обнаружение олигонуклеотида oligoRIBO-11 методом матрично- активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) .....	88
2.22	Обнаружение проникновения oligoRIBO-11-фрагмента и oligoRING- фрагмента методом спектрофотометрии.....	90
2.23	Статистический анализ.....	90
РАЗДЕЛ 3 ВЛИЯНИЕ КОРОТКИХ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ ФРАГМЕНТОВ АНТИАПОПТОЗНЫХ ГЕНОВ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БЕЗВИРУСНОГО ШЕЛКОПРЯДА И ДРУГИХ НАСЕКОМЫХ.....		91
3.1	Повышение смертности насекомого .....	91

3.2 Снижение биомассы насекомого.....	102
3.3 Уменьшение количества самок в обработанном oligoRING-фрагментом поколения.....	107
3.4 Переход инсектицидного эффекта oligoRING-фрагмента в следующее поколение – повышение содержания кальция и магния в тканях яиц шелкопряда и снижение скорости развития эмбрионов.....	112
РАЗДЕЛ 4_ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТА ПОВЫШЕНИЯ СМЕРТНОСТИ ГУСЕНИЦ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА, ЗАРАЖЁННЫХ ВИРУСОМ ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА И ОБРАБОТАННЫХ КОРОТКИМ АНТИСМЫСЛОВЫМ ФРАГМЕНТОМ ЕГО АНТИАПОПТОЗНОГО IAP-3-ГЕНА.....	120
4.1 Повышение смертности гусениц, которых заразили ВЯП НШ в лабораторных условиях.....	120
4.2 Снижение биомассы гусениц, которых заразили ВЯП НШ в лабораторных условиях.....	133
4.3 Повышение смертности гусениц, которые были заражены ВЯП НШ в природе.....	135
РАЗДЕЛ 5_ОБНАРУЖЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА НА ДЕЙСТВИЕ OLIGORING-ФРАГМЕНТА АНТИАПОПТОЗНОГО IAP-3-ГЕНА ВЯП НШ У БЕЗВИРУСНЫХ И ЗАРАЖЁННЫХ ЭТИМ ВИРУСОМ ГУСЕНИЦ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА.....	138
5.1 Безвирусные гусеницы непарного шелкопряда.....	138
5.1.1 Доказательство проникновения oligoRING-фрагмента в клетки непарного шелкопряда.....	138
5.1.2 Снижение экспрессии антиапоптозного IAP-1-гена непарного шелкопряда под действием oligoRING-фрагмента антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ.....	141
5.1.3 Обнаружение антиапоптозного IAP-Z-гена шелкопряда, обладающего высокой степенью гомологии с антиапоптозным IAP-3-геном ВЯП НШ, и снижение его экспрессии под влиянием oligoRING-фрагмента.....	145

5.1.4 Анализ микросрезов гусениц непарного шелкопряда, контактно обработанных ДНК-олигонуклеотидами .....	155
5.2 Заражённые ВЯП НШ гусеницы непарного шелкопряда .....	166
5.2.1 Снижение экспрессии антиапоптозных генов системы взаимоотношений вирус-хозяин под действием oligoRING-фрагмента антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ .....	166
5.2.2 Детекция апоптотической "ДНК-лестницы" в заражённых ВЯП НШ гусеницах непарного шелкопряда, обработанных одноцепочечными ДНК-фрагментами .....	172
<b>РАЗДЕЛ 6 ДНК-ИНСЕКТИЦИД НА ОСНОВЕ АНТИСМЫСЛОВОГО ФРАГМЕНТА ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО 5,8S РИБОСОМАЛЬНУЮ РНК.....</b>	<b>178</b>
6.1 Антисмысловой oligoRIBO-11-фрагмент проникает в клетки гусениц непарного шелкопряда.....	179
6.2 Антисмысловой oligoRIBO-11-фрагмент вызывает смертность гусениц непарного шелкопряда, выращенных в лаборатории и устойчивых к oligoRING-инсектициду .....	184
6.3 OligoRIBO-11-фрагмент снижает концентрацию 5,8S рРНК в клетках гусениц непарного шелкопряда.....	188
6.4 Свидетельства снижения уровня биосинтеза белка в тканях гусениц непарного шелкопряда, обработанных oligoRIBO-11-фрагментом.....	190
<b>РАЗДЕЛ 7 ИЗБИРАТЕЛЬНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ДНК-ИНСЕКТИЦИДОВ НА ОСНОВЕ КОРОТКИХ АНТИСМЫСЛОВЫХ ФРАГМЕНТОВ АНТИАПОПТОЗНЫХ ГЕНОВ .....</b>	<b>193</b>
7.1 Биоразлагаемость oligoRIBO-11-фрагмента и oligoRING-фрагмента с участием тканевых дезоксирибонуклеаз .....	193
7.2 Нецелевые насекомые.....	198
7.3 Нецелевые растения.....	208
7.4 Стволовые клетки быка домашнего.....	216

ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	226
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	231
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	233

## ВВЕДЕНИЕ

Большинство экологов-теоретиков и экологов-практиков считают, что сегодня нет серьезной альтернативы инсектицидам в защите растений, принимая во внимание быстрый рост населения на фоне ежегодного сокращения посевных площадей и существенные потери от насекомых-вредителей. Необходимость контроля численности популяций насекомых-вредителей при помощи инсектицидов не подвергается сомнению, однако многие из них наносят огромный вред окружающей среде, что подталкивает к поиску и применению безопасных препаратов. Кроме этого, в сельском и лесном хозяйствах нужно постоянно применять инсектициды, меняя их каждые несколько лет, чтобы избегать возникновения устойчивости к препаратам (химическим или биологическим) со стороны целевого насекомого-вредителя (Daly et al., 1998; Gourley et al., 2011). Понимание особенностей строения современных инсектицидов, способа их действия и рисков применения является важным аспектом в создании новых эффективных и избирательных в действии инсектицидов. Инсектициды, которые смогут объединить наилучшие качества современных препаратов, окажутся наиболее востребованными регуляторами численности насекомых на рынке инсектицидов.

**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 ведётся 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, 2008a; 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 (Оберемок, 2008а). 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. Контактные применённые антисмысловые олигонуклеотиды (ДНК-инсектициды) снижают жизнеспособность целевых насекомых-вредителей (непарный шелкопряд, металловидка 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).

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 (раздел 4).

## РАЗДЕЛ 1

### БИОЛОГИЯ ИНСЕКТИЦИДОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

#### 1.1 Краткая история применения инсектицидов

Практически все время, сколько человек занимается земледелием, перед ним стоит задача защиты растений и минимизации потерь от разнообразных вредителей и болезней. Кто первым решил применить инсектициды, сказать невозможно, но произошло это, по-видимому, очень давно. Вероятно, это мог быть земледелец, который задумался о сохранении урожая от листогрызущих насекомых, или же затаившийся в засаде охотник, которого одолевали кровососущие насекомые, а он рисковал быть обнаруженным диким зверем. В любом случае, самые первые инсектициды подсказала природа.

Люди подмечали негативное действие природных соединений на различных насекомых и использовали их в повседневной жизни. Например, далматскую ромашку использовали в качестве инсектицида в Древнем Китае, а затем в средние века в Персии (Davies et al., 2007). В диком виде далматская ромашка росла на Кавказе и в Далмации (территория современных Хорватии и Черногории). С развитием химических методов анализа веществ было установлено, что цветки нескольких видов ромашки (род *Chrysanthemum* из семейства сложноцветных) обладают инсектицидными свойствами. Но наибольшее применение нашла именно далматская ромашка (*Chrysanthemum cinerifolius*), соцветия которой содержат до 1,5% пиретрина – активного инсектицидного вещества. В Европе высушенные и измельченные цветки далматской ромашки (пиретрум), обладающие свойством истреблять тараканов, клопов, мух и комаров, стали известны более 200 лет назад благодаря армянским торговцам, которые продавали их как персидский порошок (“Persian dust”, “insect powder”) (Ткачёв, 2004; Davies et al., 2007). Некоторые другие растения также пользовались и пользуются популярностью в качестве инсектицидов (Isman,

2006). Например, цветы бузины чёрной эффективно используют против тараканов (Дагаев, 1993), водный настой табака против тли (Sohail et al., 2008), водный экстракт горькой полыни против долгоносиков (Ignatowicz, 1994).

Уже с 1000 года до нашей эры в борьбе с насекомыми-вредителями начали применять природные химические препараты и среди них – неорганическую серу (для окуривания). К примеру, ещё Гомер писал в "Одиссее" и "Илиаде" об обряде "божественного и очищающего" окуривания серой, помогающего избавить человека от вшей. С 900-х годов нашей эры начали использовать мышьяк, позднее – арсенат свинца ( $PbHAsO_4$ ) и криолит ( $Na_3AlF_6$ ) как клеточные яды, а также буру ( $Na_2B_4O_7$ ) в составе приманки для обезвоживания насекомых (Попов и др., 2003). Шире химические средства защиты растений начали задействовать только с середины XIX в. В 1871 году в борьбе с колорадским жуком успешно применили парижскую зелень – смешанный ацетат-арсенит меди (II) (Alyokhin, 2009). Парижскую зелень начали широко использовать повсеместно и так продолжалось вплоть до середины XX века, в частности для борьбы с переносчиками малярии – комарами из рода *Anopheles* (Symes, 1952; Majori, 2012).

В 1874 году австрийским студентом-химиком Отмаром Цейдлером был синтезирован, пожалуй, самый известный химический инсектицид – дихлордифенилтрихлорметилметан (ДДТ) (Bate, 2007). Его инсектицидные свойства обнаружил в 1939 году швейцарский химик Пауль Мюллер, работавший в фирме "J.R. Geigy AG" (Davies et al., 2007). В 1948 году П. Мюллер получил Нобелевскую премию по медицине "за открытие высокой эффективности ДДТ как контактного яда против некоторых членистоногих". Как оказалось позднее, ДДТ был эффективен не только против членистоногих, но и многих других групп организмов, включая теплокровных.

Класс хлорсодержащих соединений, к которым принадлежал ДДТ, в 1942 году был пополнен эффективным в уничтожении насекомых-вредителей препаратом – гексахлорциклогексаном (Попов и др. 2003). Использование хлорорганических инсектицидов после 60-х годов было запрещено или ограничено (Aktar et al., 2009). При этом с каждым годом растёт количество

публикаций, связанных с оценкой их вредного влияния на окружающую среду, как напоминание о необходимости взвешенного подхода к применению химических инсектицидов.

Когда стало известно, что простые эфиры фосфорной кислоты обладают сильным инсектицидным действием, началась эра фосфорорганических инсектицидов. Первые работы в этом направлении были выполнены немецкими химиками Вилли Ланге и Гердой Крюгер, которые выполнили синтез диалкилфторфосфорных кислот в начале 30-х годов XX века. Позже немецкий химик Герхард Шрадер с сотрудниками в лаборатории конгломерата "IG Farben" синтезировал табун (1936 г.) и зарин (1939 г.), которые оказались высокоэффективными контактными инсектицидами (Шрадер, 1965). Однако из-за необычайно высокой токсичности для теплокровных животных они не нашли применения в качестве веществ для защиты растений. Тем не менее, эти работы дали серьёзный толчок для создания в период 1940-1960 гг. таких высокоэффективных фосфорорганических инсектицидов как диптерекс, малатион, негувон. В частности, применение малатиона помогло бороться с комарами-переносчиками малярии в середине XX века на территории Африки и Центральной Америки (Buratti, 2005).

Наряду с фосфорорганическими инсектицидами в середине XX века популярность приобрели карбаматы. Производные карбаминовой кислоты, которые имели инсектицидные свойства, были синтезированы в 1950-х годах. Одним из первых это сделал швейцарский химик Ханс Гисин (Metcalf, 1971). Из карбаматов примечательным является карбосульфат. Разложение карбосульфата ( $LD_{50}$  250 мг/кг для крыс) в человеке происходит по отличной от насекомых биохимической цепочке реакций, практически без сильно токсичного промежуточного вещества карбофуран ( $LD_{50}$  8 мг/кг для крыс) (Tomlin, 1995). В связи с этим опасность карбосульфата для человека намного ниже, чем для членистоногих. До техногенной катастрофы на заводе компании "Union Carbide" в г. Бхопал (Индия) в 1984 году, которая произошла в результате взрыва, производство карбаматных инсектицидов постоянно увеличивалось. После этого

их популярность пошла на убыль. Во многих странах было приостановлено производство карбарила, для получения которого использовалось взрывоопасное соединение метилизоцианат. Именно утечка метилизоцианата и стала причиной мгновенной гибели минимум 3800 тысяч человек в Бхопале (Broughton, 2005). Сейчас создаются схемы синтеза карбаматов без опасных как исходных веществ, так и побочных продуктов (Zhou et al., 2007). До сих пор метилкарбаматы и фосфорорганические инсектициды являются одними из наиболее широко применяемых классов химических инсектицидов (19% мирового рынка) и играют одну из основных роль в контроле насекомых-вредителей (Casida, 2013).

С синтезом в 1949 году аллетрина "второе дыхание" в качестве инсектицидов получили пиретрины, так как на их основе стали получать первое поколение пиретроидов. Неоценимый вклад в расшифровку структуры пиретринов и синтез первых пиретроидов сделали химики-органики, такие как Роберт Вудворд, Дерек Бартон, Герман Штаудингер и др. Малотоксичные для теплокровных пиретроиды быстро завоевали популярность среди фермеров и домохозяек, которые заботились о своём здоровье. Однако на мировом рынке инсектицидов в начале 70-х годов перметрин, циперметрин, дельтаметрин имели серьёзный недостаток: они сравнительно быстро теряли активность в условиях внешней среды из-за ультрафиолета (Ткачёв, 2004). На данный момент пиретроиды составляют 17% мирового рынка инсектицидов (Davies et al., 2007).

Наиболее часто используемыми химическими инсектицидами на сегодняшний день являются неоникотиноиды (Yamamoto, 1999; Goulson, 2013). Они действуют системно, перемещаясь в растительных тканях и защищая все части растения, а также широко применяются для протравливания семян. Действуя как нейротоксины на большинство членистоногих, они обеспечивают эффективную борьбу с насекомыми-вредителями (Goulson, 2013). Неоникотиноиды необратимо блокируют никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, вызывая сверхстимуляцию нервных клеток и паралич насекомого. Самым первым неоникотиноидом, который попал на рынок инсектицидов, стал имидаклоприд, зарегистрированный как "Nashikusan" в Японии в 1993 году.

Сейчас имидаклоприд является наиболее часто используемым инсектицидом в мире (Yamamoto, 1999; Jeschke et al., 2011).

За последние 20 лет рынок неоникотиноидов существенно расширился и на нём можно встретить большое количество представителей данной группы: ацетамиприд, тиаметоксам, динотефуран, тиаклоприд (Blacquiere et al., 2012). В 2008 году неоникотиноиды составляли 24% мирового рынка инсектицидов (Jeschke et al., 2011). Среди относительно новых химических инсектицидов, которые используются сегодня для защиты растений, нужно отметить макроциклические лактоны, диамиды, аналоги нереистоксина, циклические кетенолы, фенилпиразолы.

Помимо химических инсектицидов, о которых было сказано выше, и на создание которых в большей степени повлияло развитие химии, применяются и биологические препараты. Одними из первых использование биологических препаратов для защиты растений предложили Луи Пастер и Илья Мечников в 70-е годы XIX века (Sanchis, 2011). Из биологических препаратов на практике чаще всего используются инсектициды бактериальной и вирусной природы.

Среди бактериальных препаратов важное место занимают препараты на основе грамположительной, спорообразующей почвенной бактерии *Bacillus thuringiensis*. Первые успешные попытки использовать препараты на основе *Bacillus thuringiensis* были предприняты в конце 20-х годов на непарном шелкопряде в США (Metalnikov, 1929). Для биозащиты используются как споры этой бактерии, так и её ромбовидные белковые эндотоксины (сгу-белки), разные классы которых обладают высокой специфичностью в действии на целевых насекомых (из отрядов чешуекрылых, двукрылых, жёсткокрылых, перепончатокрылых) и безвредные для позвоночных животных и других насекомых (de Maagd et al., 2001). На рынке инсектицидов имеется большое количество препаратов на основе *B. thuringiensis*: "Бикол", "Битоксибациллин", "Agree", "Сгумах", "Lepinox", "Novodor" и др. На сегодняшний день препараты на основе *B. thuringiensis* составляют 75% рынка биологических препаратов и 4% рынка всех инсектицидов (Sanchis, 2011). На примере биологических препаратов,

в частности бактериальных, можно сделать вывод, что чем сложнее устроен инсектицидный агент, тем он более избирателен в действии и его дороже производить. Не являются этому исключением и вирусные препараты.

Практически все зарегистрированные вирусные препараты, которые используются для защиты растений, сделаны на основе ДНК-содержащих бакуловирусов (Бахвалов, 2001; Szewczyk et al., 2006). Бакуловирусные препараты широко начали использовать после того, как американский микробиолог Эдвард Штейнхауз в 1945 году впервые применил вирус ядерного полиэдроза против люцерновой желтушки (Тарасевич, 1985). Впоследствии вирусные препараты зарекомендовали себя как дорогие и избирательные в действии агенты контроля насекомых, действующие эффективно, но медленно (Rosell et al., 2008). Медленное действие бакуловирусов связано с латентным периодом в жизненном цикле вируса, когда паразиту нужно "осмотреться" в клетке и подчинить себе её метаболизм. Бакуловирусы представлены двумя фенотипами – почкующийся вирус и вирус, происходящий из вирусных полиэдров. Первый фенотип передаёт вирусную инфекцию от клетки к клетке, а вирус в составе вирусных полиэдров – от насекомого к насекомому (Jehle et al., 2006). Процесс формирования полиэдров идёт пока ядро не заполнится ими полностью. Как следствие, в одной личинке может сформироваться около  $10^{10}$  полиэдров, составляющие более 30% сухой массы насекомого (Miller et al., 1983). Вирусные полиэдры состоят из нуклеокапсидов вируса, одетых группой или по отдельности внешней мембраной и погружённых в матрикс из белка полиэдрина, обладающего высокой устойчивостью к различным факторам среды (Chiu et al., 2012). Именно на основе вирусных полиэдров создаются бакуловирусные препараты для перорального заражения листогрызущих насекомых. Сейчас на рынке бакуловирусных препаратов представлено большое количество наименований: "Вирин-ЭНШ" и "Gurcheck" для контроля непарного шелкопряда, "Вирин-ХС" для контроля хлопковой совки, "Вирин-АББ" для контроля американской белой бабочки и др. По интенсивности применения бакуловирусные препараты значительно уступают препаратам на основе *B. thuringiensis*.

Поиск новых и усовершенствование имеющихся препаратов продолжается. Синтезируются и создаются новые химические инсектициды (например, пиретроиды 4-го поколения), генетически модифицируются бакуловирусы для ускорения их действия на насекомых (Inceoglu et al., 2006; Rosell et al., 2008). Подбираются более эффективные серотипы энтомопатогенных бактерий, создаются рекомбинантные бактерии (Federici et al., 2010), а также генетически модифицированные растения, продуцирующие бактериальные токсины (сгубелки) внутри растительной клетки (Sanchis, 2011). Ведётся разработка и совершенно новых подходов к контролю насекомых-вредителей. Одним из таких направлений для защиты растений является создание инсектицидов на основе природных полимеров – нуклеиновых кислот. В частности, разрабатываются ДНК-инсектициды на основе коротких одноцепочечных фрагментов антиапоптозных генов (Оберемок, 2008a; Oberemok, 2014; Oberemok et al., 2016), а также препараты на основе длинных двухцепочечных фрагментов РНК (Wang et al., 2011; Gu, 2013). В основе идеи разработки и применения таких препаратов лежат методы инактивации экспрессии важных для жизни клеток генов с помощью применения антисмысловых ДНК-олигонуклеотидов (Weiss et al., 1999; Dias, 2002; Lu et al., 2004) и двухцепочечных фрагментов РНК, действующих по механизму РНК-интерференции (Fire et al., 1998; Wang et al., 2011). Данные препараты обладают высоким потенциалом в избирательности действия, который будет зависеть от комбинации азотистых оснований в применяемом участке нуклеиновой кислоты. По сути, развиваясь по спирали, история применения инсектицидов в лице препаратов на основе нуклеиновых кислот снова вернулась к инсектицидам природного происхождения.

## **1.2 Описание и механизм действия некоторых инсектицидов**

В процессе создания чего-либо нового учёные всегда оценивают уже имеющиеся разработки в изучаемом вопросе, чтобы учесть преимущества и

недостатки существующих препаратов и препаратов, которые по разным причинам уже не используются широко. Не является исключением и создание инсектицидов. История применения препаратов для регуляции численности насекомых-вредителей накопила большой опыт, который следует использовать для создания новых инсектицидов. Одной из важных проблем регуляции численности насекомых-вредителей является возникновение резистентности к инсектицидам, которое подталкивает исследователей к постоянному поиску новых препаратов. Например, с введением каждого нового класса инсектицидов – карбаматов, органофосфатов, пиретроидов, препаратов *B. thuringiensis* – устойчивость к инсектицидам возникала в течение от двух до 20 лет (Daly et al., 1998; Weston et al., 2013).

Современные агенты для защиты растений можно разделить на две большие группы: химические инсектициды и биологические препараты. Наиболее часто в защите растений используют быстродействующие и доступные химические инсектициды, обладающие длительным периодом полураспада и отсутствием избирательности в действии. Характерным и хорошо известным представителем химических инсектицидов является ДДТ.

### ДДТ

ДДТ (Рисунок 1.1) представляет собой белое кристаллическое вещество, оно не имеет вкуса и практически не имеет запаха.

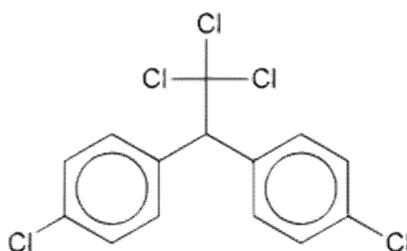


Рисунок 1.1 – Структура ДДТ

Относится к классу хлорорганических инсектицидов. ДДТ активен практически против всего спектра насекомых, включая такие отряды, как

перепончатокрылые, чешуекрылые, двукрылые, прямокрылые. ЛД<sub>50</sub> для крыс при введении ДДТ перорально составляет 113 мг/кг (Bhuiyan et al., 2009). Период полураспада ДДТ зависит от условий окружающей среды и в среднем для сельскохозяйственных почв составляет 10-10,5 лет (Diamond, 1996; Harner et al., 1999). Период полураспада в сыворотке крови человека составляет 10 лет (Turusov et al., 2002).

Точный механизм инсектицидного действия ДДТ до конца не изучен. Считается, что ДДТ влияет на процесс передачи нервных сигналов, что приводит к неконтролируемому функционированию натрий-калиевого насоса нейронов (Davies et al., 2007). Это приводит к мышечным спазмам и гибели насекомого. В наше время ДДТ запрещён в большинстве стран мира кроме двадцати трёх стран Африки, Азии и Латинской Америки, которые продолжают использовать ДДТ для борьбы с насекомыми-переносчиками болезней (Turusov et al., 2002).

### Дихлофос

Дихлофос (Рисунок 1.2) представляет собой бесцветную жидкость с приятным запахом.

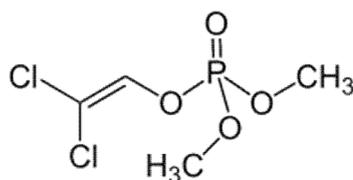


Рисунок 1.2 – Структура дихлофоса

Одними из первых дихлофос синтезировала группа исследователей немецкой фирмы "Фарбенфабрикен Байер" под руководством Герхарда Шрадера в 1954 году (Шрадер, 1965). Дихлофос является высоколетучим фосфорорганическим соединением. ЛД<sub>50</sub> для крыс при введении перорально составляет около 28 мг/кг (Chedi, 2010). ЛД<sub>50</sub> для комнатной мухи при локальном нанесении составляет 0,14 мг (Шрадер, 1965). Период полураспада дихлофоса в среднем составляет несколько суток, но может быть и нескольких недель

(Deivendran et al., 2006; Gan et al., 2006). Дихлофос эффективен против чешуекрылых, афид, двукрылых. Предполагается, что в конце 80-х гг. XX в. 60% всего производимого дихлофоса шло на защиту растений. Как и другие инсектициды группы органофосфатов, дихлофос необратимо связывается с гидроксильной группой серина, входящего в состав активного центра ацетилхолинэстеразы (Wang et al., 2004). Комплекс дихлофос-ацетилхолинэстераза разрушается длительное время – от нескольких суток до нескольких недель. Ацетилхолин является нейротрансмиттером в нервно-мышечных синапсах. При стимуляции нервного окончания потенциалом действия ацетилхолин высвобождается в синаптическую щель и связывается с постсинаптическим рецептором. Сразу после этого ацетилхолинэстераза гидролизует ацетилхолин, прекращая его эффект, что предотвращает постоянную стимуляцию рецептора, которая может вызвать блокаду синапса. Торможение активности ацетилхолинэстеразы сопровождается накоплением в синапсе ацетилхолина и избыточной стимуляцией нервной системы, что является основным токсическим эффектом фосфорорганических соединений (Yang et al., 2008). Из-за необычайно высокой токсичности для теплокровных животных дихлофос не нашёл широкого применения в качестве препарата для защиты растений. Человек погибает от отравления дихлофоса на 1-2 сутки в результате паралича дыхания.

### Карбарил

Карбарил (Рисунок 1.3) представляет собой кристаллы без цвета и запаха.

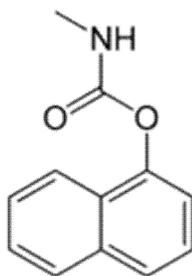


Рисунок 1.3 – Структура карбарила

Относится к группе карбаматов. Был изобретён сотрудниками американской компании "Union Carbide" в 1958 году. Относится к классу карбаматов. ЛД<sub>50</sub> для крыс при введении перорально составляет от 500 до 850 мг/кг (Kidd, 1987). Период полураспада (гидролиза) карбарила в окружающей среде при pH=7 составляет 12 суток (Carpenter, 1990). Инсектицидное действие карбарил проявляет, ингибируя работу карбоксиэстераз, включая ацетилхолинэстеразу. Карбарил в отличие от фосфорорганических инсектицидов обратимо ингибирует ацетилхолинэстеразу, связываясь с её активным центром. Карбамоилированный фермент реактивируется в течение нескольких минут или часов. Обычно этого времени достаточно для гибели насекомого. Насекомое погибает в результате сверхстимуляции нервной системы. Применяется против молей, тараканов, жуков, муравьёв, комаров (Yang et al., 2008).

#### Дельтаметрин

Дельтаметрин (Рисунок 1.4) представляет собой бесцветные кристаллы без запаха.

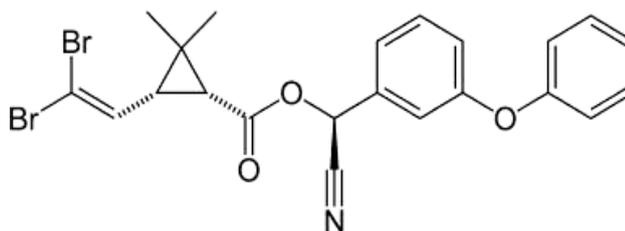


Рисунок 1.4 – Структура дельтаметрина

Относится к группе пиретроидов 2-го поколения. ЛД<sub>50</sub> для крыс при введении перорально составляет 150 мг/кг (Manna et al., 2006). По отношению к американскому таракану ЛД<sub>50</sub> дельтаметрина составляет 0,05 мкг/г (Ткачёв, 2004). Период полураспада дельтаметрина в почве составляет 2,2 недели (Ortiz-Perez, 2005). Дельтаметрин обладает паралитическим (нокаутующим) действием. Он увеличивает время входа ионов натрия через натриевые каналы, что влечёт за собой постоянную деполяризацию нервного волокна и прекращения аксонального

проведения. Дельтаметрин также блокирует ингибиторные пути деполяризации мембраны, взаимодействуя с ГАМК-зависимыми хлорными каналами. Вещество устойчиво при действии высокой температуры, света и при растворении в воде. Его применяют для обработки одежды и тентов, но не наносят на кожу подобно пиретринам. В коммерческих препаратах дельтаметрина содержатся дополнительные соединения, усиливающие его проникновение через хитиновые покровы насекомых, а также снижающие метаболизм инсектицидов и активность оксидаз, метаболизирующих дельтаметрин, – пиперонилбутоксид и *n*-октилбициклогептандикарбосимид (Fakoorziba et al., 2009). Кроме этого, многие применяемые в быту инсектициды на основе дельтаметрина включают в себя фосфорорганические соединения и карбаматы. Дельтаметрин парализует насекомое, а фосфорорганические соединения и карбаматы быстро приводят его к гибели, вызывая сверхстимуляцию нервной системы. Дельтаметрин эффективен против комаров, мух, клещей, тараканов, клопов, вшей (Davies et al., 2007).

Для теплокровных пиретроиды менее токсичны, чем инсектициды других групп. Это обусловлено тем, что они либо сразу элиминируются, либо метаболизируются (благодаря лабильности эфирной связи), после чего выводятся из организма. Эстеразы, гидролизующие пиретроиды, у теплокровных гораздо более активны, чем у насекомых (Ткачѳв, 2004).

### Димилин

Димилин (Рисунок 1.5) является белым кристаллическим веществом без запаха.

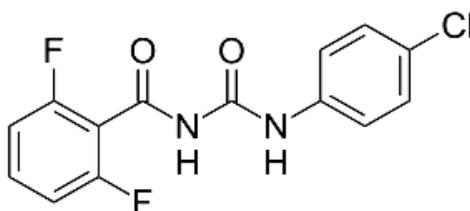


Рисунок 1.5 – Структура димилина (дифлубензурана)

ЛД<sub>50</sub> для крыс и мышей при введении перорально составляет выше 4640 мг/кг. Дифлубензурон был разработан голландскими учёными в 70-е гг. XX в. на основе двух гербицидов: дихлобенила и диурана. Разработанный препарат оказался слабым гербицидом, однако имел выраженную инсектицидную активность.

Период полураспада в полевых условиях составляет от 2 до 35 дней. Микроорганизмы играют главную роль в исчезновении дифлубензурана из почвы. Дифлубензурон является инсектицидом с выраженным ларвицидным действием и был первым коммерчески доступным представителем класса ингибиторов синтеза хитина. Блокирует встраивание глюкозы в растущий хитиновый полимер (Clarke, 1990), в результате чего недоразвитый хитиновый покров (кутикула) насекомого не выдерживает внутреннего давления и разрывается. Гибель насекомого наступает сравнительно медленно, в течение 2-3 недель после применения препарата (Зинченко, 2005).

Димилин сегодня широко используются против шелкопрядов, плодовых совок, саранчовых, мух и комаров (Msangi et al., 2011). Помимо нецелевых наземных насекомых, дифлубензурон токсичен для большого круга водных насекомых и ракообразных (Swift et al., 1988).

### Имидаклоприд

Имидаклоприд (Рисунок 1.6) представляет собой бесцветные кристаллы без запаха.

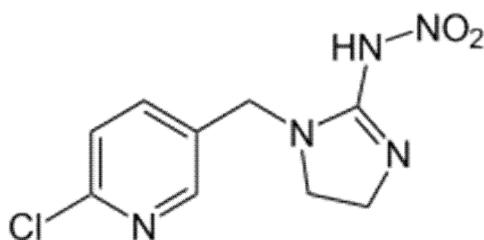


Рисунок 1.6 – Структура имидаклоприда

Является самым продаваемым инсектицидом в мире с объемом продаж 1091 миллион американских долларов за 2009 год. Он зарегистрирован для использования на 140 сельскохозяйственных культурах в более чем 120 странах мира (Jeschke et al., 2011).

Имидаклоприд является системным инсектицидом, который блокирует никотинэргические рецепторы ацетилхолина, присутствующие в избытке у насекомых. Это вызывает длительное открытие натриевых каналов, что приводит к нарушению проведения импульсов нейронами и смерти насекомого (Mencke, 2002). ЛД<sub>50</sub> для крыс при введении перорально составляет 4870 мг/кг. В зависимости от условий окружающей среды полураспад имидаклоприда длится от 18 до 31 суток. Использование имидаклоприда связывают со снижением численности во всём мире важного опылителя – медоносной пчелы (Vonmatin et al., 2005; Girolami et al., 2009), что подталкивает к переоценке массового применения этого агента.

В отличие от химических инсектицидов, биологические препараты избирательны в действии, однако менее доступны и медленно оказывают инсектицидный эффект на целевое насекомое. Из биологических препаратов на практике чаще всего используются инсектициды бактериальной и вирусной природы. Для создания бактериальных препаратов чаще всего используется споры *B. thuringiensis* и её кристаллический эндотоксин, а для вирусных – полиэдры вирусов ядерного полиэдроза насекомых.

### *Bacillus thuringiensis*

Бактерию *Bacillus thuringiensis* открыл и изолировал японский биолог Ишевата Шигетане в 1901 году на тутовом шелкопряде и дал ей первоначально название *Bacillus sotto* (Federici et al., 2010). Эрнст Берлинер повторно обнаружил эту бактерию в 1915 году в погибших гусеницах мучной моли и дал ей родовое название *thuringiensis* в честь провинции Тюрингия (Германия), откуда был исследуемый материал. Связь патогенности бактерии с её белковыми кристаллическими включениями была установлена Эдвардом Штейнхаусом в

начале 50-х годов XX века (Steinhaus, 1951; Angus, 1954). Для гибели насекомых достаточно очень небольшая концентрация растворов. *Bacillus thuringiensis* не опасна для животных и человека. Препараты на основе *Bacillus thuringiensis* представляют собой споровокристаллический комплекс, который состоит из живых спор бактерии размером 5x1 мкм и кристаллического эндотоксина белковой природы (сгу-белок) (Рисунок 1.7).

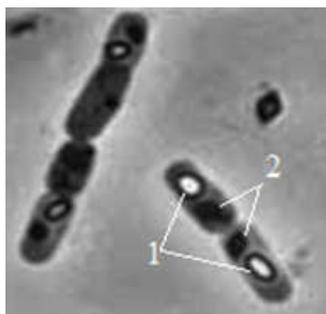


Рисунок 1.7 – Клетки *Bacillus thuringiensis* в фазе споруляции: 1 – споры, 2 – скопления сгу-белка

Эффективность препаратов проявляется только при попадании в кишечник насекомого. При достаточной дозе гусеницы прекращают питаться, перестают двигаться, меняют окраску, сморщиваются, чернеют и массово погибают. Иногда в препарате содержится также термостабильный экзотоксин. Кристаллы оказывают инсектицидное действие на насекомых только при пероральном попадании, разрушая средний кишечник насекомого. Кристалл эндотоксина бактерии представляет собой ромбовидную белковую молекулу массой преимущественно 133-150 кДа. Эндотоксин в виде протоксина растворяется в пищеварительном соке кишечника насекомого при pH равной около 9,5. После растворения он расщепляется протеазами кишечника и образуется активный сгу-токсин с молекулярной массой 55-65 кДа (Sanchis et al., 2011), который проникает сквозь перитрофическую мембрану к клеткам кишечника (Federici et al., 2010). Активный токсин, прикрепляясь к мембране эпителия среднего кишечника, нарушает её целостность и вызывает уравнивание концентраций ионов снаружи и внутри клетки. Это приводит к потере отрицательного заряда клеткой, и она

погибает (Sanchis et al., 2011). При этом понижается рН кишечника насекомого (Federici et al., 2010). Понижения рН кишечника личинок необходимо *B. thuringiensis* с целью создания благоприятных условий для активации её спор и деления. Дальнейшее размножение бактерии происходит в теле хозяина, куда она попадает, разрушив кишечник насекомого (Sanchis, 2011). Бактериальные препараты приводят к гибели насекомых в течение 1-6 суток (Moazami, 2012).

### Вирус ядерного полиэдроза непарного шелкопряда (ВЯП НШ)

Первые упоминания о полиэдрозе шелкопрядов были зафиксированы ещё в Древнем Китае 5000 лет назад. (Rohrmann, 2008). В конце XIX века полиэдрозы шелкопрядов начали упоминаться в связи с "болезнью верхушки деревьев" (Hoover et al., 2011). В норме в промежутках между кормлениями на растениях непарный шелкопряд живёт в земле (Clem, 2013). Из-за нарушения поведения вследствие заражения вирусом гусеницы шелкопрядов стремятся попасть к верхушкам деревьев, где погибают (Katsuma et al., 2012). Характерной особенностью бакуловирусов является их способность вызывать массовые эпизоотии в популяции своих хозяев с гибелью в короткие сроки большей её части (Бахвалов, 2001). Смертность особей в природе может достигать 80%. Это обстоятельство является весомой причиной для пристального внимания исследователей к бакуловирусам. Нужно отметить, что практически все зарегистрированные вирусные препараты, которые используются для защиты растений, созданы именно на основе бакуловирусов (Бахвалов, 2001), что делает эту группу микропатогенов особо актуальной для изучения.

ЛД<sub>50</sub> для непарного шелкопряда колеблется в зависимости от штамма вируса ядерного полиэдроза и составляет приблизительно от 100 до 700 полиэдров на гусеницу второго возраста (Ebling et al., 2004; Duan et al., 2011). Безвреден для других отрядов насекомых, теплокровных животных и человека (Szewczyk et al., 2009), хотя известно, что бакуловирусы способны проникать в клетки млекопитающих без дальнейшей репликации (Kost et al., 2005). Некоторые

исследования направлены на создание "универсальных" рекомбинантных бакуловирусов, у которых имеется более широкий круг хозяев.

Вирус может быть перенесен в клетки хозяина в экспериментальных условиях путем инъекции, через яйца насекомых, пищу. В природе заражение гусениц чаще всего происходит пероральным путем (Бахвалов, 2001). В жизненном цикле ВЯП НШ встречаются два морфологически различных, но генетически идентичных фенотипа вируса, которые играют отдельную роль в передаче вирусной инфекции. Вирионы, происходящие из полиэдров (Рисунок 1.8), распространяют вирусную инфекцию от насекомого к насекомому, а почкующийся вирус – от клетки к клетке внутри хозяина (Volkman, 1997; Jehle et al, 2006; Clem, 2013).

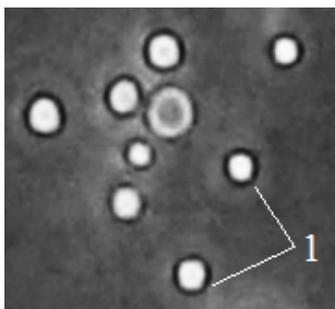


Рисунок 1.8 – Полиэдры (1) ВЯП НШ

Вирус попадает в клетки хозяина путем объединения внешней мембраны вириона с цитоплазматической мембраной клетки. Это происходит в среднем кишечнике в щелочной среде (до pH=12), где высвобождаются вирионы, происходящие из полиэдров (Бахвалов, 2001). Вирионы транспортируются через ядерную пору в ядро, где инициируется их репликация. Через 2-4 часа после инфицирования в нуклеоплазме начинают происходить процессы репродукции вирусов (Kawanishi et al., 1972). Для близкородственного ВЯП НШ вируса ядерного полиэдроза хлопковой совки установлено, что через 12 часов с момента инфицирования 38% транскриптов клетки составляют транскрипты вирусного генома (Clem, 2013). Естественный процесс апоптоза клеток насекомого блокируется белками вируса, кодирующимися антиапоптозными генами (Bertin et

al., 1996; Manji et al., 1997; Miller et al., 1997; Srinivasula, 2008; Ikeda et al. 2011). В процессе репродукции вируса в ядрах клеток насекомого накапливаются вирусные полиэдры диаметром около 1-2 мкм (Slavicek et al., 2001).

Гибель насекомого происходит в результате обводнения тканей (Харсун, 1976). К концу болезни внутренние органы личинок превращаются в мутную жидкость без гнилостного запаха (Злотин, 1989). Покровы тела личинок истончаются и при незначительных механических воздействиях разрываются, что сопровождается выделением гемолимфы и других разрушенных тканей, содержащих большое количество вирусных полиэдров (Гулий, 1988; Злотин, 1989). Время между заражением и смертью насекомого составляет около 10-14 суток в зависимости от размера личинки, вирусной дозы и температуры окружающей среды (Reardon et al., 2009).

Таким образом, биологические препараты уступают в скорости и доступности химическим инсектицидам. В свою очередь химические инсектициды уступают биологическим препаратам в безопасности. В такой ситуации правильным решением было бы вести поиск и разработку химических инсектицидов, которые обладают высокой избирательностью в действии. Другими словами, объединить лучшие качества современных инсектицидов в одном препарате. На первый план в этом вопросе должны выйти природные соединения, которые не будут обладать длительным периодом полураспада и значительным негативным влиянием на нецелевые организмы.

На данный момент известно, что только нуклеиновые кислоты, РНК и ДНК (Рисунок 1.9), используя определённые комбинации азотистых оснований, способны передавать информацию к синтезу белков в клетках, а через них к синтезу и деградации различных веществ и управлению клеткой, что в конечном счёте выражается в разного рода фенотипических эффектах, в том числе запрограммированной гибели клеток – апоптозе. Инактивация экспрессии функционально важных для жизни клетки генов (например, антиапоптозных или кодирующих рибосомальную РНК) при помощи фрагментов нуклеиновых кислот по механизмам действия антисмысловых олигонуклеотидов (Dias, 2002) и РНК-

интерференции (Gu, 2013) может оказаться эффективным инструментом контроля численности листогрызущих насекомых. Различные комбинации азотистых оснований в составе олигонуклеотидов будут эффективны против определённого насекомого-вредителя, а их синтез может быть автоматизирован на современных ДНК-синтезаторах, управляемых компьютерами.

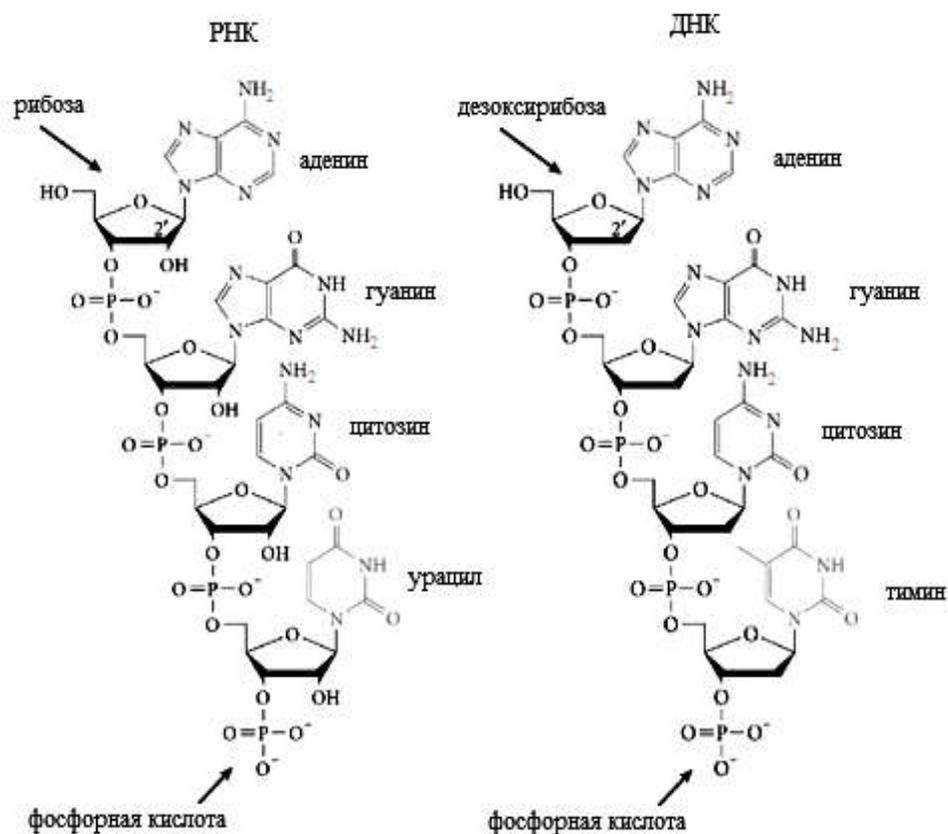


Рисунок 1.9 – Структура одноцепочечных РНК и ДНК

### 1.3 Необходимость применения инсектицидов и причины создания новых препаратов

Всего двести лет назад нашу планету населял 1 миллиард человек, а сегодня – около 7,5 миллиардов. Быстрый рост численности населения стал возможным благодаря развитию науки и прежде всего медицины и биотехнологии. Несмотря на стремительное развитие научного потенциала, уровень жизни большого

количества людей граничит с чертой бедности. Около 40 000 людей каждый день умирает от голода. В развивающихся странах каждого пятого беспокоит недостаток питания, особенно в сельской местности (Atinmo et al., 2009). В большом количестве развивающихся странах распространен дефицит витамина А, железа и йода (Hunt, 2005; Atinmo et al., 2009; Mirmiran et al., 2012). Около 300 миллионов человек ежедневно борются за выживание, и тысячи из них, особенно дети, проигрывают это сражение (Atinmo et al., 2009; Gulati, 2010).

В 2007 году на приобретение инсектицидов в мировом масштабе было потрачено 11,2 миллиарда долларов, что составляет 28% всех мировых затрат на пестициды. Во многом сложившаяся ситуация объясняется огромным уроном, который приносят урожаю абиотические (засоленность и засуха) и биотические (вредители и болезни) факторы. Среди вредителей наибольший вред урожаю наносят представители класса насекомых. Более 10 000 видов вредных насекомых могут поражать сельскохозяйственные культуры (Dhaliwal et al., 2007). Они вызывают усыхание деревьев, полностью или частично повреждают сельскохозяйственные и лекарственные растения, уменьшая их урожайность, вызывают порчу хранящейся сельскохозяйственной продукции, переносят вирусные и протозойные болезни, портят внешний вид декоративных растений. При этом, например, ареал колорадского жука на территории Северной Америки, Европы и Азии уже достигает 16 млн. км<sup>2</sup> и продолжает расти (Weber, 2003). А в США только в 1981 году популяции непарного шелкопряда привели к дефолиации 12,9 миллионов акров лесов (McManus et al., 1989).

Несмотря на то, что каждый день появляются новые инсектициды для защиты растений, повышаются затраты на их защиту, стоимость потерь от вредных насекомых находится почти на одном и том же уровне – около 30% предурожайной части и 10% послеурожайной части продукции (Sanchis, 2011). Принимая во внимание быстрый рост населения на фоне ежегодного сокращения посевных площадей и существенные потери от вредных организмов, большинство специалистов считают, что серьезной альтернативы инсектицидам на сегодня нет (Webster, 1999), так как они помогают сохранить 20% всего урожая (Oerke, 2004).

Также невозможно переоценить роль инсектицидов в предупреждении вирусных и протозойных заболеваний (Aktar et al., 2009). Чего стоит тот факт, что переносимые комарами заболевания распространены в более чем 100 странах мира, среди которых малярия, жёлтая лихорадка, японский энцефалит, филяриатоз и другие. При этом каждый год во всем мире при участии насекомых различными болезнями заражаются более 700 миллионов человек и только при помощи инсектицидов можно реально снизить уровень заболеваемости (Ghosh et al., 2012).

Нужно отметить, что в природе численность насекомых-вредителей регулируется паразитами естественным путём без вмешательства человека. При этом вспышки численности насекомого сменяются со временем их снижением (модель Вольтерры-Лотки) (Royama, 1971; Weisberg, 2008). Это постоянный и неконтролируемый человеком процесс. В агробиоценозах же численность насекомых нужно поддерживать на постоянном низком уровне, чтобы сохранить урожай. Кроме этого, нужно учитывать r-стратегию выживания насекомых, при которой формируется большое количество потомков (Одум, 1986; Karunaratne, 1998), которые в короткие сроки могут уничтожить целевое растение, а также быстро выработать генетическую устойчивость к применяемому инсектициду.

Исходя из модели Вольтерры-Лотки, во время снижения численности насекомого-вредителя под действием его паразитов (вирусов, бактерий и др.) с некоторым запаздыванием снижается и численность самих паразитов (Weisberg, 2008). При этом в популяции насекомого в фазе снижения численности остаются преимущественно особи с такими генотипами, которые адаптированы к паразитам с генотипами, преобладающими в данный момент в популяции паразита. В сложившейся ситуации популяция насекомого начнёт расти пока в популяции паразита (вследствие мутаций) не появятся особи, способные вновь подавить численность насекомого-вредителя. Такую же цепочку рассуждений можно перенести на систему "химический инсектицид–насекомое-вредитель", за единственным исключением, что химический инсектицид самостоятельно, т.е. без участия человека, не способен к изменениям. Исходя из такого положения дел, в

сельском и лесном хозяйстве нужно постоянно применять инсектициды, меняя их каждые несколько лет, чтобы избежать возникновения устойчивости к препаратам (химическим или биологическим) у насекомого-вредителя (Daly et al., 1998; Read et al., 2009; Gourley et al., 2011).

Беря во внимание такие генетические механизмы как мутации, случайное расхождение гомологичных хромосом во время мейоза, кроссинговер, амплификация генов цитохром P<sub>450</sub>-монооксигеназ и др. невозможно представить каким образом насекомое может быть лишено возможности адаптироваться к инсектицидам. В результате возникавшей устойчивости, оперативный срок действия химических инсектицидов для контроля малярии в районах с их широким применением в среднем был всего около пяти лет (Koella et al., 2009). Ещё в 1979 году United Nations Environmental Program (Программа Организации Объединённых Наций по окружающей среде) декларировала устойчивость к пестицидам как одну из серьёзных проблем окружающей среды мирового масштаба (Sanchis, 2011). Общим механизмом возникновения резистентности является отбор, который приводит к возрастанию частоты аллелей резистентности в популяции вредителя, образовавшихся в результате случайных мутаций.

Возникновение устойчивости к инсектицидам является примером дарвиновской микроэволюции. Большинство экспертов сходятся во мнении, что если не уменьшать давление естественного отбора, то всегда возникает устойчивость к используемому инсектициду (Рисунок 1.10). Бывают и случаи, когда не вырабатывается устойчивость к инсектицидам. В качестве примера можно привести отсутствие возникновения устойчивости к ДДТ со стороны мухи цеце (Hemingway, 2000). Этот факт объясняется тем, что данное насекомое оставляет мало потомства, что не даёт возможности возникнуть "удачной" мутации, и можно считать одним из исключений из правила "возникновения устойчивости к инсектицидам". То есть, устойчивость возникает, но очень медленно. Возникновение у насекомых резистентности к инсектицидам является нормальным эволюционным явлением, приводящим к адаптации вредителя к условиям обитания. В этой связи невозможно говорить об инсектициде, который

на длительный срок (несколько десятилетий) сможет решить проблему контроля какого-либо насекомого-вредителя, возможно, что за рядом некоторых исключений.

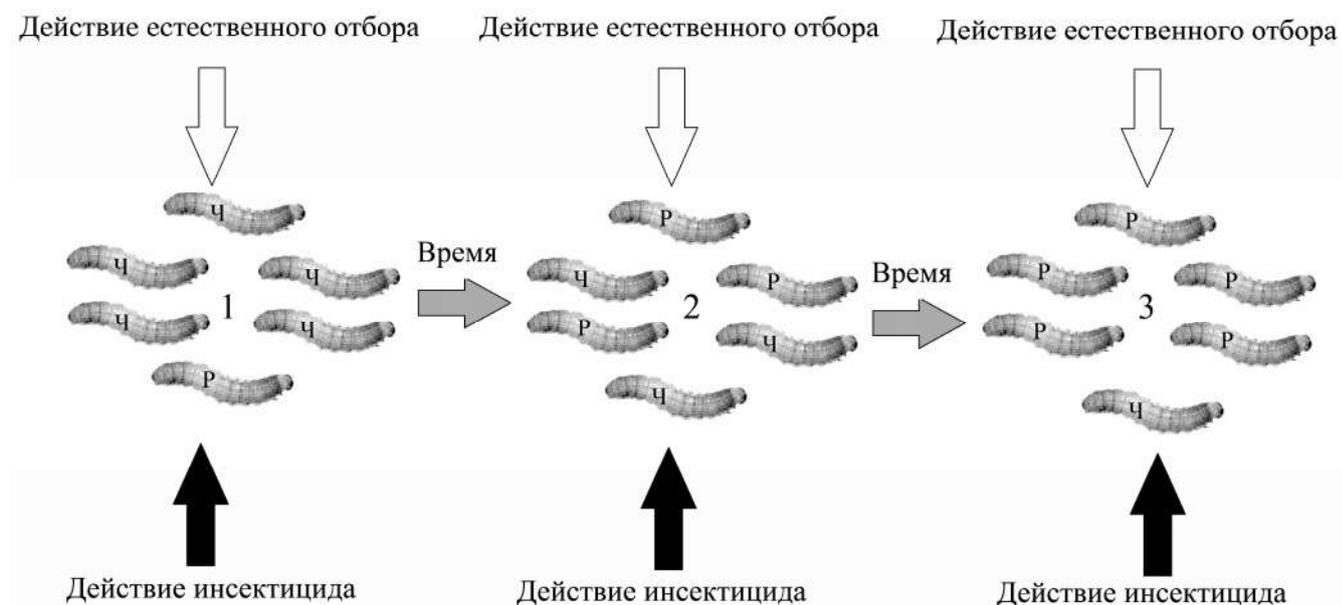


Рисунок 1.10 – Схема возникновения устойчивости к инсектицидам: 1, 2, 3 – состав популяции в генерациях насекомого-вредителя, изменяющийся со временем под действием применяемого инсектицида и естественного отбора; Ч – чувствительные к действию инсектицида особи насекомого; Р – резистентные к действию инсектицида особи насекомого.

Таким образом, альтернатива современным инсектицидам заключается лишь в том, чтобы создавать и использовать избирательные и как можно менее опасные для окружающей среды новые препараты (Van Steenwyk, 2005; Koella et al., 2009; Read et al., 2009). И в первую очередь это касается химических инсектицидов (карбаматы, органофосфаты, неоникотиноиды и др.), так как биологические препараты (бактерии, вирусы) обладают минимальным негативным эффектом на окружающую среду, являясь при этом менее доступными и менее эффективными, чем химические препараты.

В этой связи перспективной идеей сегодня является разработка ДНК-инсектицидов на основе коротких антисмысловых фрагментов генов насекомых-вредителей (Oberemok et al., 2016; Oberemok et al., 2017; Oberemok et al., 2018). ДНК-инсектициды могут улучшить состояние проблемы возникновения устойчивости к препаратам для защиты растений со стороны насекомых. Если для их создания будут использованы короткие антисмысловые фрагменты (длиной 11-20 нуклеотидов) из консервативных частей антиапоптозных генов (например, RING-домена) или генов, кодирующих 5,8S рРНК (например, последовательность, содержащая высококонсервативный GAAC-участок), то устойчивость к таким инсектицидам будет расти медленнее. Это связано с тем, что мутации в высококонсервативном участке гена возникают очень редко, поэтому и реже будет изменяться целевой участок РНК-мишени, с которым комплементарно будет взаимодействовать антисмысловый олигонуклеотид, например, oligoRING-инсектицид для посттранскрипционной инактивации синтеза соответствующего антиапоптозного белка (Sharma et al., 2014). По сути, взаимодействие антисмыслового ДНК-инсектицида будет происходить в той части комбинации азотистых оснований мРНК, которая изменяется очень медленно. Это идея выглядит очень прогрессивно, так как ДНК-инсектициды могут стать первым препаратом, которые будут "перепрыгивать" генетическую устойчивость, обусловленную возникновением мутаций в переменных участках целевого гена. А именно переменные участки целевых генов приводят к быстрой (в течение нескольких лет) генетической устойчивости к химическим инсектицидам со стороны насекомых. Даже если представить себе маловероятную ситуацию быстрого возникновения устойчивости к такому ДНК-инсектициду, то достаточно просто можно будет учесть возникшую мутацию в популяции насекомого-вредителя и немного поменять последовательность ДНК-инсектицида или разработать новый препарат на основе ещё одного консервативного сайта целевого гена.

#### **1.4 Вредные последствия использования химических инсектицидов для окружающей среды**

Химические и биоактивные свойства инсектицидов, попавших в окружающую среду, делают неизбежным их включение в процессы биоаккумуляции и биотрансформации. В процессе биоаккумуляции происходит многократное повышение концентрации инсектицида (биомагнификация) по мере продвижения его по пищевым цепям (Essumang et al., 2009; Hu et al., 2010, 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.

Подсчитано, что при обработке посевов и насаждений только 0,1–1,0% вносимых инсектицидов достигают насекомых-мишеней, тогда как 99,0–99,9% попадают в почву, водоемы, атмосферу, сельскохозяйственное сырье и оттуда в организмы животных и человека. Химические инсектициды, составляющие большую часть мирового рынка инсектицидов, распространяются по пищевым цепям, в которых участвуют не только целевые насекомые-вредители, но и другие участники экосистемы. Например, установлено, что ДДТ способен накапливаться в жировой ткани у животных и человека. Несмотря на его низкую растворимость в воде, в водных организмах происходит его биоконцентрация. Содержание ДДТ в ряде гидробионтов доходит до десятков миллиграмм на 1 кг живой массы (Мельников, 1987). Наряду с биоаккумуляцией инсектицидов происходят и процессы их биотрансформации. Попавший в окружающую среду инсектицид рано или поздно подвергается разложению либо в организмах растений, животных или в микроорганизмах, либо под действием физико-химических факторов среды. При этом процессы разложения могут сопровождаться как детоксикацией инсектицидов (Sogorb, 2002) – потерей исходным веществом токсических свойств, так и токсификацией – образованием более ядовитых

веществ. Например, попавшая мимо целевого насекомого-вредителя молекула малатиона под действием солнечного света окисляется в более токсичный малаоксон. Малаоксон является более опасным уже не только для насекомых, но и для теплокровных животных (Aker et al., 2008).

Необходимо учесть и то, что каждый вид насекомого-вредителя, численность которого подлежит регулированию, обитает вместе с сотнями видов организмов, численность которых изменять нежелательно. Особенно это касается естественных врагов насекомых-вредителей, которые могут достигать десятков видов (McManus et al., 1989; Cappaert et al., 1991). Например, на определённых ареалах колорадского жука в Мексике можно встретить его 18 видов-паразитов из класса насекомых (Cappaert et al., 1991), которых уничтожать нежелательно. Как с ювелирной точностью регулировать численность только целевого насекомого-вредителя, не затрагивая нецелевых организмов, а при этом делать это быстро, эффективно, недорого, подолгу избегая резистентности со стороны насекомого? В этом случае действительно нужно применить глубокие знания биологии и химии, чтобы создавать подобные инсектициды. Одно можно сказать точно, что пока таких препаратов на мировом рынке инсектицидов нет.

Общая картина затрат и выгод от использования инсектицидов заметно отличается между развитыми и развивающимися странами. В отличие от развитых стран, для развивающихся стран крайне важно использовать инсектициды, так как отказ от их использования грозит быстрым наступлением голода и ростом числа инфекционных заболеваний, таких как малярия. Но наш подход к использованию инсектицидов должен быть прагматичным. Другими словами, все действия, связанные с разработкой и применением инсектицидов, должны быть основаны на научных доводах, а не на коммерческих соображениях (Aktar et al., 2009). Например, такие часто используемые инсектициды, как органофосфаты, являются высокотоксичными для человека. Фосфорорганические инсектициды являются мутагенами, тератогенами, а также с ними связывают большое количество современных заболеваний нервной и иммунной системы, среди которых болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера и

др. Это подчёркивает необходимость более тщательного изучения токсикологических характеристик фосфорорганических и других инсектицидов (Ragnarsdottir, 2000). Отмечаются также отравления контаминированными продуктами, случайные профессиональные интоксикации и даже употребление инсектицидов с целью самоубийства. Подсчитано, что в Азии каждый год от самоотравления фосфорорганическими инсектицидами умирает в среднем 200 000 человек (Eddleston et al., 2008), а в сельской местности в Китае самоотравление пестицидами составляет 60% всех самоубийств (Phillips et al., 2002). Конечно, на вторую чашу весов можно поставить спасённые жизни людей, не погибших от малярии, сыпного тифа, сонной болезни или спасённых от голодной смерти урожаем, защищённым инсектицидами. В такой ситуации нужно стремиться, чтобы чаша весов с негативными воздействиями инсектицидов на окружающую среду была как можно менее увесистой.

Возвращаясь к вопросу разработки препаратов для защиты растений на основе нуклеиновых кислот, нужно отметить, что РНК-препараты и ДНК-инсектициды способны разрешить проблему длительного периода полураспада химических инсектицидов, так как во всех клетках есть естественные пути деградации нуклеиновых кислот. В целом, разрабатываемые ДНК-инсектициды способны объединить в себе наилучшие качества современных инсектицидов: доступность с быстроедействием от химических инсектицидов и избирательность в действии от биологических препаратов.

### **1.5 Преимущества современных агентов регуляции численности насекомых как предпосылки к созданию ДНК-инсектицидов**

Химические инсектициды действуют быстро (Vale et al., 2008) и являются доступными (Walker, 2000; Aktar et al., 2009). Преимущество химических инсектицидов заключается в возможности их быстрого применения в тех случаях, когда возникает необходимость незамедлительного уничтожения

размножившихся в большом количестве насекомых-вредителей. Недостатками химических инсектицидов являются отсутствие избирательности в действии (Aktar et al., 2009) и длительный период полураспада, который может длиться годами в зависимости от температуры, pH, освещённости, микробного состава почвы и т.д. (Wheatley, 1962; Ragnarsdottir, 2000; Krupke et al., 2012).

Химические инсектициды действуют быстро, потому что это небольшие молекулы, которые, обладая сродством к определённому компоненту клетки, отключают его функциональную активность. По сути, проникновением химического инсектицида в клетку управляют законы физики и химии: диффузия и чаще всего слабое химическое взаимодействие. Таким образом, если имеется небольшой участок билипидного слоя мембраны клетки без других компонентов углеводной и белковой природы, то, например, гидрофобная молекула ДДТ легко проникнет через него в клетку как насекомого, так и млекопитающего, не проявляя избирательности. Крупные по размерам бактерии и вирусы попадают в клетки через сложные механизмы взаимодействия с рецепторами цитоплазматической мембраны, которые практически всегда являются видоспецифичными для каждого отдельного микропатогена (Rohrman, 2008). Дальнейший эффект химического инсектицида зависит от его встречи с целевой молекулой в клетке. То есть, если химический инсектицид способен проникнуть в клетку насекомого, а создают именно такие инсектициды, то скорость и амплитуда действия инсектицида будет зависеть от его концентрации. Например, для карбаматов и фосфорорганических инсектицидов целевой молекулой является ацетилхолинэстераза (Fukuto, 1990; Yang et al., 2008), которая способствует нормальной передаче нервных импульсов на мышечные волокна насекомого. Если доза инсектицида высока, то ацетилхолинэстераза быстрее выходит из строя и насекомое погибает от последствий сверхстимуляции нервной системы, если доза мала – последствия воздействия наступают медленно.

У биологических препаратов, например, бакуловирусных, совсем другая "философия". Их вирулентность (способность заражать) и патогенность полностью зависят от генетики микропатогена. Например, из-за мутаций

(преимущественно делеций и инсерций) гена 25K FP вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) непарного шелкопряда (НШ), вирус формирует небольшое количество полиэдров (Bischoff, 1997) и хуже передаёт инфекцию внутри популяции насекомого-вредителя. Различные мутации гена *plcR*, плейотропного регулятора транскрипции многих других генов *Bacillus thuringiensis*, резко снижают цитотоксические свойства этой бактерии (Slamti et al., 2004). Таким образом, для вирусов и бактерий генетика может оказаться как их слабостью, так и их силой.

Биологические препараты избирательны, но действуют медленно (Bale et al., 2008; Rosell, 2008; Sanchis, 2011) и их дорого (Moscardi, 1999) или относительно дорого (Rowe, 1987) производить. В основе избирательности биологических препаратов лежит специализация патогена на определённом виде насекомого-вредителя или на узком круге близкородственных видов (Sanchis, 2011; Rollie, 2013). Это связано с тем, что для размножения в клетках насекомого-хозяина микропатоген вынужден преодолеть барьеры в виде перитрофической мембраны эпителиальных клеток кишечника, цитоплазматической мембраны клетки, иммунной системы насекомого (Asser-Kaiser et al., 2010). Кроме этого, паразит должен подчинить себе основные системы жизнеобеспечения клетки-хозяина, такие как биосинтез белка, апоптоз-антиапоптозную систему, энергетический обмен (Rohrmann, 2008; Katsuma et al., 2012; Ikeda et al., 2013). Все эти барьеры видоспецифичны, так как их реализация закодирована в уникальном геноме каждого отдельного вида насекомого.

Например, в геноме вирусов ядерного полиэдроза насекомых имеются антиапоптозные гены (IAP-гены) (Srinivasula, 2008; Ikeda et al., 2011). Антиапоптозные гены вирусов обладают своей уникальной последовательностью азотистых оснований, в которых закодирована уникальная последовательность аминокислот в антиапоптозных белках. Антиапоптозные белки, в свою очередь, будут максимально эффективными только для одной пары взаимоотношений вирус-хозяин. Это связано с тем, что в ходе коэволюции в каждой отдельной паре взаимоотношений вирус-хозяин у вируса остаются антиапоптозные белки, которые наиболее эффективно задерживают развитие апоптоза клеток

насекомого-хозяина, создавая возможность вирионам размножиться в них (Herniou et al., 2004). Легко представить, что, например, антиапоптозные белки ВЯП НШ будут менее эффективны против апоптозных белков клеток совки-ипсилона, чем непарного шелкопряда. В связи с этим, перспективным направлением исследований сегодня является разработка ДНК-инсектицидов на основе коротких одноцепочечных фрагментов антиапоптозных генов вирусов ядерного полиэдроза насекомых (Оберемок, 2008a; Oberemok, et al., 2018), которые будут инактивировать экспрессию этих генов по механизмам действия антисмысловых олигонуклеотидов (Dias, 2002) и РНК-интерференции (Wang et al., 2011). Филогенетический анализ показал, что в ходе эволюции антиапоптозные гены, как и многие другие гены, были заимствованы вирусами ядерного полиэдроза у их хозяев и являются гомологичными им (Hughes, 2002). Данный факт может пригодиться на практике. Например, в настоящее время нет полной геномной последовательности непарного шелкопряда, серьезного вредителя леса, но секвенирована последовательность генома ВЯП НШ (Kuzio et al., 1999). В такой ситуации вирусный геном может дать ценную информацию о некоторых жизненно важных генах вируса, которые имеют клеточное происхождение, например, антиапоптозных генах. Последовательность этих генов может быть использована для борьбы с насекомым. Перспектива такого подхода четко видна на практике, поскольку она обеспечивает инсектицидный эффект с меньшими усилиями. Вместо дорогого бакуловирального препарата можно использовать короткие участки вирусного генома и получить тот же результат. Такие препараты будут избирательными в действии и безвредны для других членов экосистемы, так как последовательность генома разных видов насекомых уникальна. Кроме этого, подобно химическим инсектицидам, технологию синтеза олигонуклеотидов можно сделать недорогой, а их действие не будет замедляться процессами, свойственными целой вирусной частице (латентный период, биосинтез вирусных белков, репликация генома вируса). Таким образом, ДНК-инсектициды могут занять промежуточное положение между химическими и биологическими препаратами, объединив их наилучшие качества (Рисунок 1.11).

Микробиопрепараты на основе *B. thuringiensis* также обладают достаточно высокой специфичностью (которая уступает бакуловирусным препаратами) и эффективно действуют преимущественно на личинок насекомых из отрядов чешуекрылых, двукрылых, жёсткокрылых и перепончатокрылых. *Bacillus thuringiensis* является безвредной для нецелевых организмов (de Maagd et al., 2001). Исследования показывают, что определенные факторы могут влиять на эффективность и избирательность Vt-токсинов по отношению к насекомому. Эти факторы разнообразны и включают другие Vt-токсины или части спор *Bacillus thuringiensis*, стресс, инфекционные заболевания и др.

Дорогое производство биологических препаратов связано с необходимостью культивирования целевых насекомых, их дальнейшим заражением, сбором урожая микропатогена и приготовлением препарата. Себестоимость такого препарата будет дороже по сравнению со среднестатистическим химическим инсектицидом (Rowe, 1987; Moscardi, 1999). Хотя некоторые авторы не согласны с таким мнением и считают биологические препараты экономически более выгодными. Они связывают это с тем, что создание, токсикологические тесты и маркетинг химических инсектицидов являются более дорогими, поэтому биологические препараты с этой точки зрения являются экономически более выгодными в применении. Тем не менее, они соглашаются с тем, что контроль с помощью химических инсектицидов является более быстрым, а также гарантирован высокий и предсказуемый уровень смертности насекомых при отсутствии устойчивости к применяемому препарату (Bale et al., 2008). Медленное действие биологических препаратов связано с тем, что микропатогены, в отличие от химических инсектицидов, преследуют цель размножиться в клетках насекомого-хозяина. В связи с этим, микропатогены не стремятся уничтожить насекомое сразу, а используют ресурс его клеток для размножения. Бактериальные препараты приводят к гибели насекомых в течение 1-6 суток (Moazami, 2012), вирусные – 4-7 суток и более (Stewart et al., 1991). Исследователи стараются повысить скорость инфекционного процесса, вызываемого микропатогенами (Inceoglu et al., 2006).

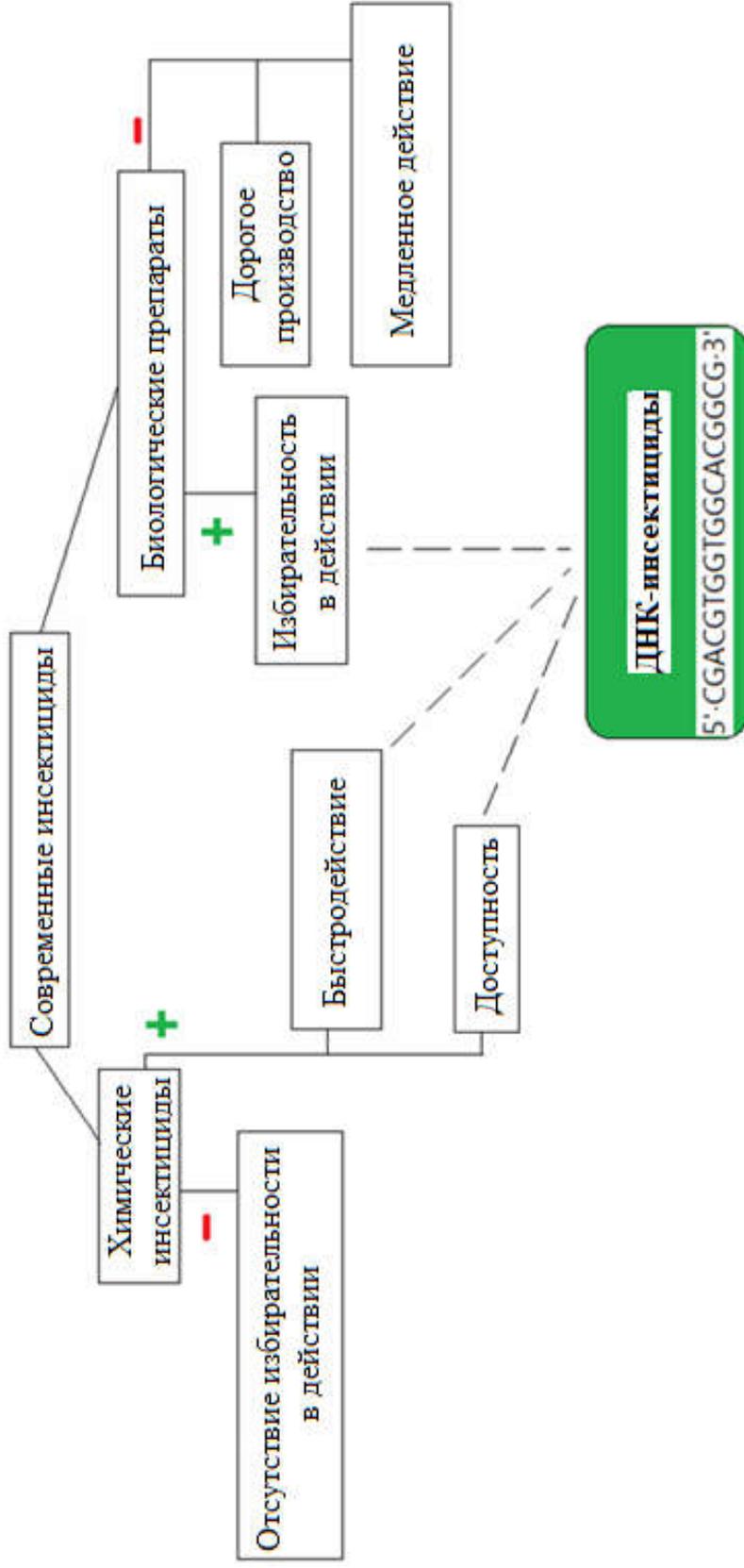


Рисунок 1.11 – Преимущества (+) и недостатки (-) инсектицидов для защиты растений и перспективы разработки ДНК-инсектицидов, которые могут объединить в себе лучшие характеристики современных препаратов

Медленная скорость действия бакуловирусных препаратов подталкивает исследователей к созданию большого числа рекомбинантных бакуловирусов, главным образом с генами, кодирующими специфические для насекомых токсины от скорпионов или пауков, которые убивают насекомых быстрее, чем вирус-прародитель дикого типа. Кроме этого, имеются специфические недостатки, присущие отдельным классам биопрепаратов. Например, недостатками биопрепаратов на основе *B. thuringiensis* является то, что они являются неэффективными против насекомых, питающихся внутри тканей растения (Sanchis, 2011), их активное действие зависит от высокой пищевой активности целевого насекомого, что наблюдается при температуре не ниже 18°C (Белов, 2003). Кроме того, такие препараты инактивируются при высокой температуре и освещенности (за исключением стабильного экзотоксина) (Sanchis, 2011). Вирусы ядерного полиэдроза насекомых более адаптированы к условиям "вне организма". Происходящие из вирусных полиэдров вирионы, передающие инфекцию от насекомого к насекомому, устойчивы к различным факторам окружающей среды. Это возможно благодаря устойчивому белку полиэдрину, образующему матрикс полиэдров, в который погружены вирионы (Coulibaly et al., 2009; Chiu et al., 2012). Но как уже не раз было сказано выше, не только целые и сложно устроенные вирусные частицы можно использовать для контроля численности насекомых, а и одноцепочечные фрагменты ДНК вирусов. Это звучит так же неожиданно, как если бы стало известно, что ДДТ способен кодировать аминокислотную последовательность белков. Разберёмся в вопросе возможности создания ДНК-инсектицидов более детально.

## **1.6 Особенности разработки ДНК-инсектицидов с высоким уровнем экологичности**

Новым классом инсектицидов для борьбы с насекомыми-вредителями могут стать биопрепараты на основе коротких одноцепочечных ДНК-фрагментов

вирусов ядерного полиэдроса – ДНК-инсектициды (Оберемок, 2008а; Oberemok et al., 2018). ДНК-инсектициды способны вызывать гибель целевых насекомых-вредителей по механизмам, схожим с действием антисмысловых олигонуклеотидов (Weiss et al., 1999; Sharma et al., 2014) и поздними этапами РНК-интерференции (Wang et al., 2011; Yu et al., 2013). Рассмотрим подробнее механизм действия двухцепочечных фрагментов РНК (РНК-интерференцию) и антисмысловых ДНК-олигонуклеотидов.

Эндрю Файр и Крейг Мелло в 1998 г. открыли механизм РНК-интерференции и внесли весомый вклад в его изучение в экспериментах с круглым червем *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998). РНК-интерференция – процесс подавления экспрессии гена на стадии транскрипции и трансляции при помощи двухцепочечной РНК-копии (чаще всего длиннее 200 п.н.) соответствующего гена (Tomoyasu et al., 2008). В итоге биосинтез целевого белка блокируется. На ранних этапах РНК-интерференции происходит разрезание двухцепочечного РНК-фрагмента ферментом *dicer* (РНКаза III-го типа) на более короткие фрагменты длиной 20-30 п.н. (Carmell, 2004; Obbard et al., 2009). Далее эти короткие фрагменты объединяются с белками из семейства *argonaute* (Parker, 2006). Формируются комплексы RISC (RNA-induced silencing complex, РНК-индуцированный блокирующий комплекс) и RITS (RNA-induced transcriptional silencing, РНК-индуцированная блокировка транскрипции), содержащие короткий фрагмент антисмысловой РНК. Данные комплексы блокируют экспрессию генов на стадии транскрипции и трансляции, присоединяясь комплементарно и блокируя или деградируя пре-мРНК и мРНК (Рисунок 1.12).

Возможна и последующая системная РНК-интерференция с участием РНК-зависимой РНК-полимеразы, усиливающей сигнал (синтез новых двухцепочечных РНК-копий на основе имеющихся) в клетках, в которых началась первичная РНК-интерференция (Timmons et al., 2003). К сожалению, системная РНК-интерференция отсутствует у представителей отряда двукрылых и чешуекрылых (Terenius et al., 2011), что ограничивает применение данного подхода в защите растений. Результатом РНК-интерференции является прерывание биосинтеза

определённой белковой молекулы. Тонкие детали данного процесса пока изучены недостаточно. Процессы РНК-интерференции обнаружены в клетках многих эукариот (Mello, 2004): у животных, растений и грибов.

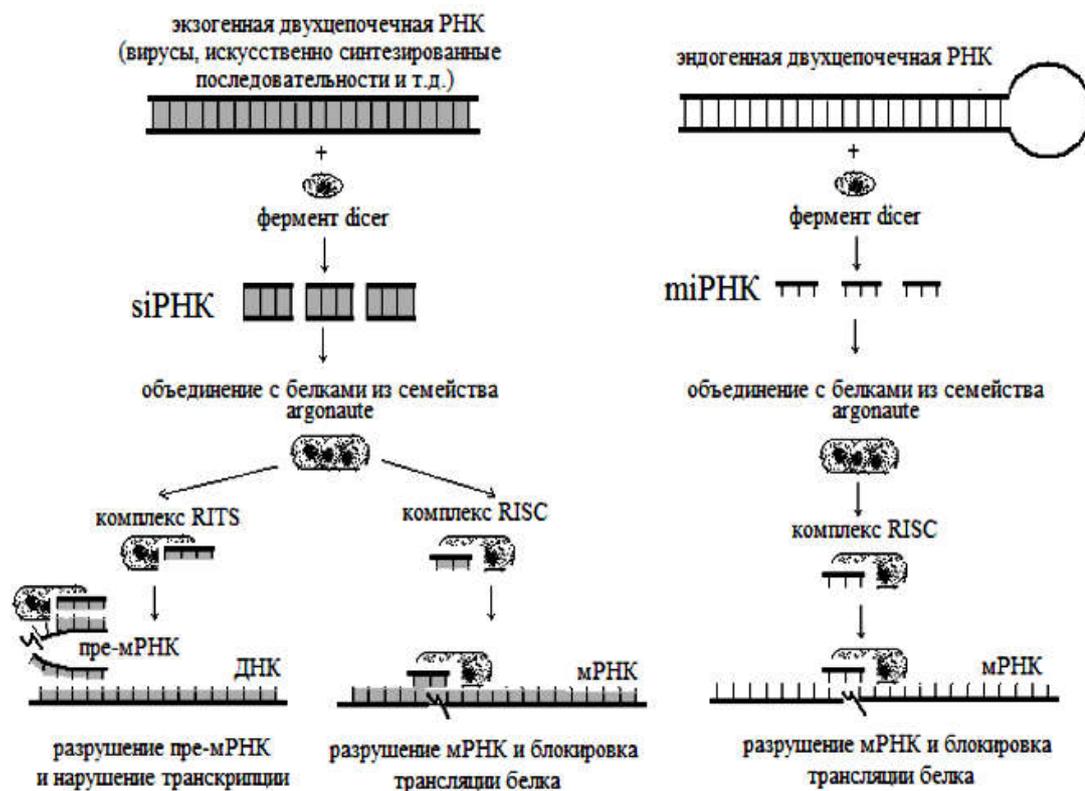


Рисунок 1.12 – Схема РНК-интерференции

Система РНК-интерференции играет важную роль в защите клеток от вирусов, транспозонов, а также в регуляции развития, дифференцировки и экспрессии генов организма (Obbard et al., 2009). РНК-интерференция обладает высокой специфичностью и эффективностью (Niuvenne, 2010). Таким образом, если необходимо заблокировать определённый ген по механизму РНК-интерференции, то создаётся его полная копия или её часть в виде двухцепочечной РНК и вносится в клетку. Конечно, если необходимо заблокировать экспрессию гена на стадии трансляции белка, а не транскрипции, то эффективнее вносить двухцепочечную молекулу РНК, состоящую из антисмысловой последовательности и комплементарной ей смысловой

последовательности, повторяющей мРНК гена. Это исключит интронные участки и повысит эффективность РНК-интерференции.

В случае коротких антисмысловых ДНК (10-25 нт) имеют место процессы, которые похожи на поздние этапы РНК-интерференции (Рисунок 1.13). Пол Замечник и Мэри Стефенсон первыми в 1978 г. успешно применили концепцию действия антисмысловых олигонуклеотидов (Zamesnik, 1978). Для этой цели они использовали специфический антисмысловой ДНК-фрагмент длиной 13 нт для ингибирования репликации вируса саркомы Рауса и трансформации клеток у эмбрионов кур. В той же серии экспериментов авторы улучшили активность олигонуклеотида путем введения химических модификаций на 3'- и 5'-концах, что уменьшило его деградацию клеточными нуклеазами. Год спустя, в 1979 году, Элен Донис-Келлер представила результаты, показывающие, что РНКаза Н расщепляет цепь РНК в гетеродуплексах РНК-ДНК сайт-специфическим образом (Donis-Keller, 1979).

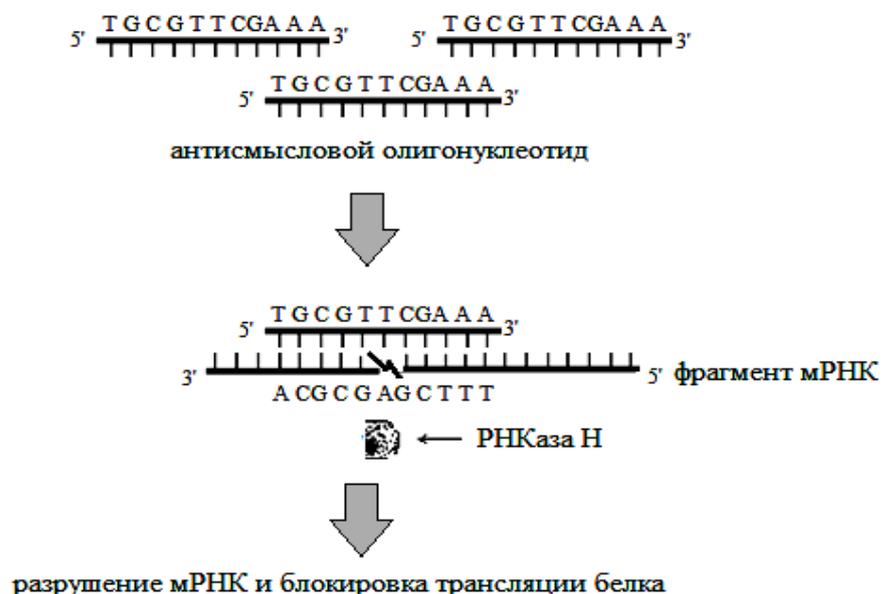


Рисунок 1.13 – Схема действия антисмысловых олигонуклеотидов

Антисмысловые олигонуклеотиды в теории разработаны специально для модулирования передачи генетической информации, но механизмы, с помощью которых олигонуклеотид может вызвать биологический эффект, являются

тонкими и сложными. По механизму действия можно выделить два класса антисмысловых олигонуклеотидов: (а) РНКазы Н-зависимые олигонуклеотиды, которые индуцируют деградацию целевой мРНК и (б) олигонуклеотиды-стерические блокаторы, которые физически (в результате комплементарного спаривания с мишенью) предотвращают или ингибируют сплайсинг, а также трансляцию белка.

Большинство модифицированных (фосфоротиоаты, "закрытая" нуклеиновая кислота, 2'-О-метоксиэтильная ДНК), разработанных в основном для медицины (Dias, 2002; Grunweller, 2007; Eckstein, 2014), и немодифицированных антисмысловых олигонуклеотидов действуют в клетке при участии РНКазы Н-зависимого механизма. РНКазы Н являются ферментом, деградирующим РНК-нить в дуплексе РНК-ДНК. Высвобожденный при этом антисмысловой ДНК-олигонуклеотид может далее присоединиться к целевым мРНК и способствовать их деградации. Снижение экспрессии целевого белка может при этом достигать 80-95%. Кроме того, в отличие от олигонуклеотидов-стерических блокаторов, РНКазы Н-зависимые олигонуклеотиды могут ингибировать экспрессию белка практически в любой области целевой мРНК. Большинство же олигонуклеотидов-стерических блокаторов эффективны только тогда, когда взаимодействуют с целевой мРНК в районе 5'-конца или в иницирующей трансляцию области кодона AUG (Dias, 2002). Важным моментом при разработке антисмысловых олигонуклеотидов является установление наиболее эффективных последовательностей. Оптимальные мишени в составе мРНК для антисмысловых олигонуклеотидов современными теоретическими подходами пока невозможно предсказать. Это связано с тем, что в клетке на пространственную структуру мРНК, включая целевой участок-мишень для посадки определённого антисмыслового олигонуклеотида, могут действовать большое количество факторов (рН, температура, ионная сила раствора, взаимодействие с белками), весь комплекс которых просчитать достаточно сложно. Во многом поиск таких высокоэффективных антисмысловых олигонуклеотидов осуществляется экспериментальным путём.

Известно, что у бакуловирусов есть многочисленные участки генома, где транскрипты образуются с обеих цепей ДНК. Образованные транскрипты РНК способны формировать дцРНК и могут быть вовлечены в регуляцию собственных генов и генов хозяина по механизму РНК-интерференции, или напрямую, по механизму антисмысловых олигонуклеотидов (Jayachandran et al., 2012; Rollie, 2013). Таким образом, короткие оцДНК-фрагменты могут повторять клеточные механизмы регуляции экспрессии генов с той разницей, что будут формироваться не дцРНК, а гибриды ДНК-РНК, т.е. как в случае механизма действия антисмысловых олигонуклеотидов (Dias, 2002).

В целях тестирования оцДНК-фрагментов бакуловирусов для контроля численности насекомых-вредителей можно использовать различные фрагменты функционально важных для системы взаимоотношений вирус-хозяин генов, например, антиапоптозных. И необходимо при этом, чтобы антиапоптозные гены вируса были гомологичными таковым генам хозяина. В процессе эволюции некоторые вирусы, в том числе бакуловирусы, "научились" бороться с преждевременной гибелью зараженных ими клеток. У таких вирусов есть специальные антиапоптозные белки (Srinivasula, 2008; Ikeda et al., 2011), которые либо сами препятствуют действию клеточных апоптозных белков, либо так изменяют активность клеточных генов, что баланс сил сдвигается в сторону клеточных антиапоптозных белков (Агол, 1997). Бакуловирусы имеют два класса антиапоптозных генов, P35 и IAP-гены, которые могут заблокировать апоптоз в клетках хозяина (Vertin et al., 1996; Manji et al., 1997; Ikeda et al., 2011). Исследования показывают, что захват антиапоптозных генов бакуловирусами у своих хозяев происходил как минимум дважды в ходе эволюции (Hughes, 2002). Если антиапоптозные гены вируса являются гомологичными генам хозяина, то введение таких антисмысловых РНК- или ДНК-фрагментов вируса должно вызывать апоптоз клеток насекомого из-за инактивации синтеза антиапоптозных белков. Действие оцРНК- или оцДНК-фрагментов вируса, скорее всего, не будет ограничиваться механизмом блокировки генов в клетке хозяина. Например, для фрагментов РНК известно, что они способны катализировать следующие

процессы (Cech, 1986; Shechner, 2011): а) создание и разрушение ковалентных связей, в том числе и между нуклеотидами; б) некоторые специализированные молекулы РНК могут катализировать изменения в других молекулах РНК, разрезая нуклеотидную последовательность в определенном месте; в) РНК может вырезать часть своей собственной последовательности, сшивая при этом свои концы. Исходя из большого сходства в строении между РНК и ДНК, можно прогнозировать, что подобные каталитические свойства могут иметь и ДНК-фрагменты вируса. Кроме этого, для нуклеиновых кислот характерно сродство к белкам и ферментам (Cai, 2012), при котором возможно снижение или прекращение их каталитической функции. Хотя можно подбирать уникальные последовательности фрагментов ДНК для отдельного насекомого-вредителя, не исключено нанесение вреда ДНК-инсектицидами нецелевым организмам за счёт кратковременных неспецифических побочных эффектов. К примеру, известно, что продукты разрушения одноцепочечных ДНК-фрагментов (2'-дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфатов) обладают неспецифическим цитотоксическим и антипрофелиративным эффектом (Vaerman et al., 1997). Таким образом, в каждом отдельном случае разработки ДНК-инсектицидов нужно проверять специфичность их действия на нецелевых организмах, оценивая активность их ДНК-нуклеаз.

В виду наличия нуклеаз в кишечнике насекомых, одним из целесообразных и удобных способов нанесения ДНК-инсектицидов является контактная обработка (Yu et al., 2013). Известно, что наличие развитой эпикутикулы ограничивает проницаемость покровов для многих инсектицидов, но хлорорганические и другие контактные инсектициды могут растворяться в кутикулярном воске. Растворенный в воске инсектицид легко проникает в организм насекомого через наиболее проницаемые участки покровов. Такими участками, играющих роль "входных ворот" для растворенного яда, служат межсегментные мембраны, основания щетинок и очень тонкие участки эпикутикулы над нервными окончаниями. В процессе проникновения инсектицидов через покровы большое значение имеет способность хитина абсорбировать органические молекулы. Как

показали опыты с очищенным хитином, он хорошо поглощает инсектицид из водной суспензии (Тыщенко, 1986). Проникновение веществ через кутикулу, вероятно, регулируется пассивным транспортом. Одна из основных действующих сил в данном случае обусловлена градиентом концентрации проникающего вещества.

Сложные молекулы растворенного вещества проникают сквозь гидрофобную кутикулу насекомых с меньшей скоростью, чем более простые молекулы растворителя, а неполярные быстрее, чем полярные. Сквозь кутикулу в клетки могут попадать и более крупные по размерам вирусные частицы (Бахвалов, 2001). Например, при нанесении раствора с вирусом ядерного полиэдроза (10 мкл с титром  $2 \times 10^7$  полиэдров/мл) на грудные дыхальца 8-суточных гусениц хлопковой совки получили урожай  $15,2 \times 10^9$  полиэдров в 13-суточном возрасте,  $12,8 \times 10^8$  полиэдров с предкуколки и  $1,49 \times 10^8$  полиэдров с куколки на момент их гибели (Kalia, 2001). Известно, что трахеи насекомых, открывающиеся дыхальцами, заканчиваются звездчатыми клетками, из которых к каждой клетке организма насекомого подходят трахеолы, которые поставляют клеткам кислород. Вдоль трахеол вирусные частицы могут проникать в любой орган (Бахвалов, 2001). Также показано, что для пиретроидов основным путём проникновения в тело насекомого являются дыхальца (Sugiura et al., 2008). Описанный механизм попадания в организм насекомого возможен и для оцДНК-фрагментов. В целом, при проникновении нуклеиновых кислот в ткани насекомых (по литературным данным это чаще всего дцРНК) практически всегда оценивают по специфическим молекулярным и фенотипическим эффектам, таким как снижение экспрессии целевого гена и гибель насекомого (Terenius et al., 2011).

Второй важный вопрос – проникновение оцДНК-фрагментов внутрь клетки. В модельных системах через искусственные мембраны вещества переносятся вдоль градиента концентраций за счет диффузии к установлению равенства концентраций, а точнее до достижения термодинамического равновесия (пассивный транспорт) (Кагава, 1985). Но сравнительно крупные и отрицательно заряженные фрагменты оцДНК будут очень медленно проникать в клетку через

гидрофобный билипидный слой мембраны путём диффузии. Для одноцепочечных фрагментов ДНК установлено, что они попадают в клетки путём активного транспорта (Loke et al., 1989; de Diesbach, 2000). Проникновение в клетку оцДНК-фрагментов может происходить, вероятно, и при помощи установленного для дцРНК трансмембранного канал-опосредованного поглощения, показанного на *C. elegans* (Yu et al., 2013). Эксперименты по РНК-интерференции продемонстрировали, что отрицательно заряженные дцРНК способны проникать через кутикулу круглых червей (Maeda et al., 2001) и насекомых (Tomoyasu et al., 2008). Эти эксперименты показывают, что, несмотря на дополнительные барьеры, поглощение нуклеиновой кислоты всем телом насекомых возможно (Yu et al., 2013). Индукцию РНК-интерференции при местном применении дцРНК можно объяснить попаданием их во внутренние ткани через систему трахей (Gu, 2013). Фрагменты оцДНК имеют помимо гидрофильной части (полярный сахарофосфатный остов) и открытую для взаимодействия гидрофобную часть (азотистые основания), которая способна помогать им проникнуть через неполярный гидрофобный билипидный слой мембран клеток насекомого.

Исходя из сказанного выше о строении и активности химических инсектицидов и биологических препаратов, становится понятным, что наименьший вред инсектицид будет наносить окружающей среде, если он ей "знаком" и если есть пути быстрого разрушения этого вещества в клетках при помощи соответствующих ферментов. Кроме этого, инсектицид должен быть избирательным в действии и регулировать численность целевого насекомого. Таким потенциалом обладают ДНК-инсектициды. Во-первых, ДНК-инсектициды не будут иметь длительного периода полураспада, так как во всех клетках есть пути деградации нуклеиновых кислот, запускаемых ДНК-нуклеазами. Во-вторых, ДНК-инсектициды способны избирательно передавать информацию (сигнал) к гибели вредителя по механизму действия антисмысловых олигонуклеотидов (Dias, 2002; Sharma et al., 2014). Таким образом, подобрав специфическую комбинацию азотистых оснований, можно выводить из строя какой-либо функционально важный ген у отдельного вида насекомого. ДНК-инсектициды

являются первыми химическими инсектицидами, которые можно собирать, как конструктор, из сахарофосфатного остова и 4 азотистых оснований. По сути, природа дала нам в руки универсальный "язык" всего живого в виде комбинаций азотистых оснований в нуклеиновых кислотах. И при помощи нуклеиновых кислот можно решать большое количество задач, то есть "разговаривать" с природой. Таким образом, сегодня в руках человека нуклеиновые кислоты превращаются в активный инструмент воздействия на клетку. И подтверждением этому является идея разработки инсектицидов на основе нуклеиновых кислот (Оберемок, 2008a; Gu, 2013), которая активно начала развиваться в последние 10 лет и, возможно, в течение ближайших нескольких лет будет создан первый такой препарат для сельского и лесного хозяйства.

Нужно отметить, что имеется ряд преимуществ разработки ДНК-инсектицидов на основе коротких антисмысловых фрагментов ДНК по сравнению с РНК-препаратами на основе относительно длинных двухцепочечных фрагментов РНК, над созданием которых работают зарубежные учёные.

### **1.7 Трудности, связанные с разработкой РНК-препаратов для контроля численности чешуекрылых насекомых, и преимущества ДНК-инсектицидов**

За последнее десятилетие РНК-интерференция продемонстрировала высокий потенциал в борьбе с насекомыми-вредителями, в частности чешуекрылыми (Gu, 2013; Zotti, 2015). К сожалению, исследования показывают необходимость дальнейшего изучения механизма РНК-интерференции в чешуекрылых, так как она оказалась не столь прямолинейной, как показано для других насекомых, в частности жесткокрылых (Terenius et al., 2011), и имеет серьёзные недостатки, чтобы создать коммерчески доступные препараты для сельского и лесного хозяйства.

Во-первых, было отмечено, что некоторые гены чешуекрылых устойчивы к РНК-интерференции. Во-вторых, исход эксперимента зависит от динамики

синтеза целевой мРНК. Кроме того, об убедительном доказательстве причастности каскада реакций РНК-интерференции к наблюдаемым эффектам снижения экспрессии целевых генов не сообщалось ни в одном из исследований, например, с помощью обнаружения специфических малых интерферирующих РНК, образованных из вводимых двухцепочечных РНК (Terenius и et al., 2011). В-третьих, всегда есть опасение, что используемые двухцепочечные фрагменты РНК в некоторых случаях могут иметь побочные негативные эффекты для нецелевых организмов (Terenius et al., 2011; Lundgren, 2013). Это связано с тем, что относительно длинные фрагменты РНК очень часто непредсказуемо расщепляются в клетках на многочисленные и короткие (длиной около 21–23 нуклеотидов) малые интерферирующие РНК, многие из которых совпадают с геномными участками нецелевых организмов (Lundgren, 2013; Zotti, 2015) и могут влиять на экспрессию их генов. В случае использования коротких (11-20 нт) антисмысловых ДНК-инсектицидов минимизируется их влияние на нецелевые объекты, так как используемый фрагмент один и, как правило, уникален. В-четвертых, у чешуекрылых отсутствует системная РНК-интерференция, т.е. увеличение копий попавшего в клетку дцРНК-фрагмента при помощи РНК-зависимой РНК-полимеразы, что также снижает эффективность подхода. В-пятых, химический синтез больших количеств двухцепочечной РНК в настоящее время является слишком дорогим, чтобы быть более конкурентоспособными по сравнению с современными химическими инсектицидами для эффективной борьбы с насекомыми-вредителями в полевых условиях (Zotti, 2015). Синтез ДНК на сегодняшний день на порядок дешевле, чем синтез РНК. Даже если технология синтеза длинных двухцепочечных фрагментов РНК станет доступной, то способ синтеза коротких одноцепочечных фрагментов ДНК станет ещё более доступным. В-шестых, из-за наличия в рибозе 2'-ОН-группы, РНК в большей степени подвержена гидролизу и разрушению по сравнению с ДНК (Thorp, 2000), поэтому в природных условиях может быть быстро деградирована, не успев подействовать. В-седьмых, в большинстве исследований "стандартные" количества двухцепочечной РНК, вводимые для достижения РНК-интерференции

в чешуекрылых, варьируются между 1 и 100 мкг на насекомое (Terenius et al., 2011). Высокие концентрации двухцепочечной РНК, применяемые в экспериментах с насекомыми, поднимают вопрос о специфичности эффектов. Для сравнения, в опытах с ДНК-инсектицидами используется контактным путём 3-30 моль одноцепочечных фрагментов ДНК антиапоптозных генов длиной 18-20 нуклеотидов на одну гусеницу непарного шелкопряда I-II возраста, что приблизительно соответствует 1,8-180 нг ДНК на 1 мг биомассы гусеницы (собственная ДНК насекомого составляет около 0,5% биомассы гусеницы). Таким образом, ДНК-инсектицид действует в значительно более низких концентрациях. Соответственно, ДНК-инсектициды будут доступнее по сравнению с РНК-препаратами для контроля численности насекомых-вредителей. В-осьмых, вопрос доставки двухцепочечных РНК-фрагментов к целевым насекомым не решен. Генетически модифицированные сельскохозяйственные и лесные культуры дороги в производстве и имеют высокий риск к возникновению устойчивости со стороны насекомых (Tabashnik et al., 2008). Три остальных наиболее распространенных метода, используемых для доставки дцРНК-фрагментов – это микроинъекции, пероральный (кишечный) путь и контактная обработка. Метод микроинъекции чрезвычайно полезен для введения точного количества дцРНК в выбранный объект исследования, однако неосуществим в полевых условиях. Пероральный путь введения дцРНК в организм насекомого является наиболее удобным методом для крупномасштабного генного скрининга и является основным источником публикаций, касающихся применения РНК-интерференции для борьбы с насекомыми-вредителями. Например, пероральный путь введения дцРНК-фрагментов показал достоверный инсектицидный эффект на *Erythias postvittana* (Turner et al., 2006) и *Rhodnius prolixus* (Araujo et al., 2006). Однако такому способу доставки препятствуют РНКазы, находящиеся в слюнных железах и средней кишке большинства насекомых, включая чешуекрылых (Braasch, Corey, 2001), что требует введения высоких концентраций двухцепочечных РНК для достижения эффекта.

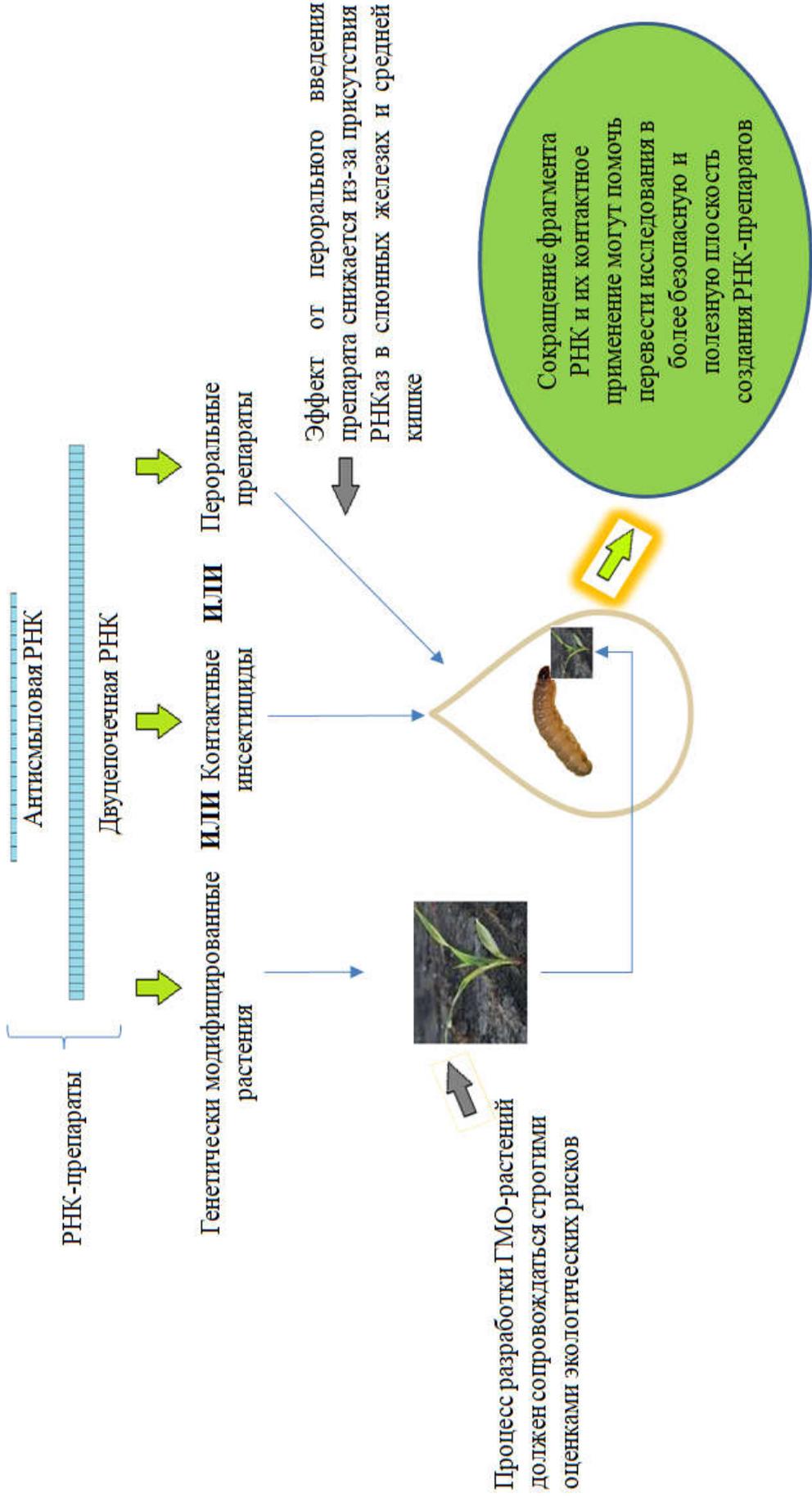


Рисунок 1.13 – Перспектива усовершенствования РНК-препаратов

Среди перечисленных способов доставки дцРНК контактная обработка представляется наиболее перспективной, поскольку большинство современных химических инсектицидов относятся к категории контактных инсектицидов. Несмотря на очевидные барьеры, было продемонстрировано, что поглощение дцРНК всем телом насекомого возможно (Wang et al., 2011; Yu et al., 2013). Wang et al. (2011) применили контактную обработку растворёнными в воде дцРНК-фрагментами на личинках *Ostrinia furnacalis*, что привело к достоверной смертности по сравнению с контролем, которая варьировала от 40% до 100%. Смертность коррелировала с подавлением экспрессии гена-мишени. Этот простой способ доставки ясно продемонстрировал возможность проникновения дцРНК-фрагментов через покровы гусениц чешуекрылых. К сожалению, количество публикаций, касающихся контактного использования РНК-препаратов ограничен. По-видимому, длина используемых фрагментов дцРНК играет решающую роль в этом вопросе. Снижение длины необходимого дцРНК-фрагмента и применение его в виде антисмыслового фрагмента могут помочь перевести разработки в области создания РНК-препаратов в более безопасную и плодотворную плоскость развития, очень близкую к концепции ДНК-инсектицидов (Рисунок 1.14).

В такой ситуации разработка ДНК-инсектицидов (Оберемок, 2008а; Oberemok, 2014; Oberemok et al., 2016; Oberemok et al., 2017; Oberemok et al., 2018) заслуживает внимания и подробного изучения. Исследования такого рода могут дать ценную информацию о том, как можно дополнить и усовершенствовать разработку препаратов на основе нуклеиновых кислот.

### **1.8 Первый эксперимент по применению ДНК-инсектицидов на непарном шелкопряде**

ДНК-инсектицидная активность была обнаружена в определённой мере незапланированно. В 2007 году были начаты исследования по изучению трансвариальной передачи ВЯП НШ. Была показана трансвариальная передача

вируса при помощи ПЦР со случайными праймерами (Оберемок, 2008b). То же самое было запланировано повторить и с помощью специфических праймеров, основываясь на геномной последовательности ВЯП НШ, которая находилась в базе данных ICTVdb (Kuzio et al., 1999).

В границах антиапоптозного IAP-3-гена вируса были подобраны два специфических праймера: прямой праймер со смысловой цепи – 5'-GCCGGCGGAАСТGGСССА-3' (oligoBIR-фрагмент) и обратный праймер с антисмысловой цепи – 5'-CGACGTGGTGGCACGGCG-3' (oligoRING-фрагмент). Данные праймеры в ходе ПЦР при наличии ДНК ВЯП НШ инициируют формирование фрагмента ДНК (ампликона) длиной 317 п.н. (Рисунок 1.15). Праймеры были подобраны правильно и на очищенных вирусных препаратах формировали ожидаемый ДНК-фрагмент длиной 317 п.н. Но при поиске вируса в тканях безвирусного непарного шелкопряда инициировали формирование большого количества ампликонов, т.е. не были в достаточной мере специфичными (Оберемок, 2011). Это говорило о том, что в геноме непарного шелкопряда были области, гомологичные фрагментам антиапоптозного IAP-3-гена вируса, что было показано и для других бакуловирусов (Hughes, 2002). Таким образом, разработанные праймеры не подходили для детекции ВЯП НШ в тканях насекомого. Далее было принято решение испытать праймеры необычным способом: были помещены небольшие капельки (объёмом около 0,3 мкл) водного раствора праймеров в концентрации 100 моль/мкл на поверхность тела гусениц непарного шелкопряда I-II возраста (около 30-40% испытываемых гусениц были заражены ВЯП НШ). Через 3-5 суток было замечено, что гусеницы начали интенсивно погибать от применённых ДНК-фрагментов вируса. В ходе самого первого эксперимента на гусеницах непарного шелкопряда на 11-й день была обнаружена достоверно более высокая смертность насекомого в опытной группе по сравнению с контролем ( $\chi^2=23,72$ ;  $df=1$ ;  $N=120$ ;  $p<0,01$ ), где была использована дистиллированная вода (Оберемок, 2008a). Данный эксперимент стал началом исследований по разработке ДНК-инсектицидов с высоким уровнем экологичности

## 1.9 Происхождение применённых против непарного шелкопряда ДНК-инсектицидов и их связь с апоптозом

Первые ДНК-инсектициды были созданы на основе фрагментов BIR-домена и RING-домена антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ (Оберемок, 2008а; Оберемок, 2011). ВЯП НШ относится к семейству бакуловирусов (Rohrman, 2008). В процессе эволюции бакуловирусы "научились" бороться с преждевременной гибелью зараженных ими клеток (Агол, 1997). У бакуловирусов есть специальные белки, IAP и P35 (Ikeda et al., 2013), которые препятствуют развитию апоптоза (Агол, 1997). При этом вирус имеет возможность реплицироваться в клетке, часто покидая насекомое, когда оно уже полностью заполнено вирусными полиэдрами. IAP-белки, как и кодирующие их IAP-гены, делятся на пять групп, IAP-1-5, в зависимости от их гомологии. За некоторыми исключениями большинство бакуловирусных IAP-белков с антиапоптозными свойствами относятся к группе IAP-3 (Ikeda et al., 2011). Все IAP-белки, выделенные из различных бакуловирусов, характеризуются двумя структурными особенностями. Первой из них является наличие N-концевых повторов аминокислотной последовательности антиапоптозных белков, именуемых BIR. Второй высококонсервативной особенностью бакуловирусных IAP-белков является область RING, расположенная у C-конца белка (Duckett et al., 1996).

Бакуловирусный домен BIR содержит около 70 аминокислот, которые координируют ион цинка с помощью остатков гистидина и цистеина (Srinivasula, Ashwell, 2008). Домен BIR обнаружен уже более чем в 80 различных белках, принадлежащих к семейству IAP (Ikeda et al., 2011). Показано, что домен BIR необходим для ингибирования различных апоптотических белков, например, цистеиновых протеаз (каспаз) путём прямого белок-белкового взаимодействия с ними, что препятствует активации прокаспаз путём гидролиза. Во время апоптоза BIR-опосредованному ингибированию каспаз эффективно противодействует семейство белков, которые имеют BIR-связывающий тетрапептидный мотив, например, аланин-валин-пролин-изолейцин, как у белка Smac (second

mitochondria-derived activator of caspases – второй митохондриальный активатор каспаз), являющегося одним из основных инактиваторов антиапоптозных белков у млекопитающих. Полноразмерный белок Smac содержит 239 аминокислот. После синтеза в цитоплазме белок Smac попадает в межмембранное пространство митохондрий. При апоптотических стимулах белок Smac высвобождается из митохондрий обратно в цитозоль и взаимодействует с IAP-белками, ослабляя их ингибирующее действие не только на индукторные каспазы, такие как каспаза-9, но и на эффекторные каспазы, такие как каспаза-3 и -7 (Shi, 2002). У насекомых, в частности дрозофилы, основную роль в инактивации белков семейства IAP играют белки reaper, hid и grim, являющимися ингибиторами белка DIAP-1 насекомого и активирующими каспазы насекомого (Huh et al., 2007).

Домен RING, состоящий в белках из 40-60 аминокислот, характеризуется наличием от шести до семи остатков цистеина и одного или двух остатков гистидина, образующих выступы в виде "пальца" и координирующих два иона цинка. Домены RING часто функционируют в виде модулей в составе различных белков, которые в сочетании с другими ферментами присоединяют убиквитин к белкам-мишеням, проявляя лигазную активность. Все известные домены RING обладают данной лигазной активностью. В качестве субстратов для них могут выступать различные молекулы, подлежащие убиквитинизации и удалению из клетки, начиная с апоптозных белков и заканчивая белками, в состав которых входят они сами (Srinivasula, 2008; Rumble, 2008).

Типичный IAP-белок животного происхождения включает в себя три гомологичных домена BIR и один домен RING. Филогенетический анализ и анализ последовательностей доменов BIR показали, что у вирусов ядерного полиэдроса имеются только два домена BIR, гомологичных второму и третьему доменам BIR в IAP-белках животных. Аналогичные анализы показали, что в случае бакуловирусного IAP-белка, имеющего только один домен BIR, он оказывается гомологичным третьему домену BIR в IAP-белке животного (Srinivasula, 2008). Именно такое строение имеет антиапоптозный белок IAP-3 ВЯП НШ. В белке IAP-3 ВЯП НШ длиной 155 аминокислот область с 6 по 71

аминокислоту относится к области BIR, а область с 105 по 149 аминокислоту принадлежит домену RING (Kuzio et al., 1999).

Для создания первых ДНК-инсектицидов были использованы следующие последовательности гена IAP-3 ВЯП НШ, кодирующего соответствующий IAP-3 белок: а) GCCGGCGGAАСТGGСССА (смысловая цепь домена BIR); б) CGACGTGGTGGCACGGCG (антисмысловая цепь домена RING) (Kuzio et al. 1999) (Рисунок 1.15).

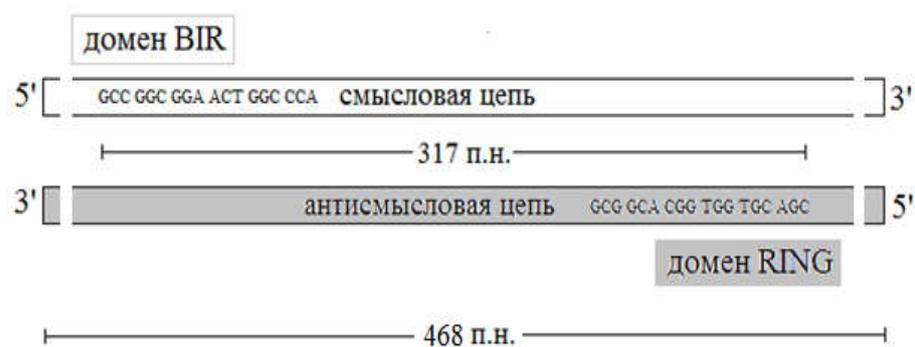


Рисунок 1.15 – Структура IAP-3-гена ВЯП НШ и локализация в нём одноцепочечных фрагментов ДНК, применённых в качестве ДНК-инсектицидов

В ходе ПЦР при наличии вирусной ДНК данные олигонуклеотиды (праймеры) инициируют формирование фрагмента ДНК (ампликона) длиной 317 п.н. (Рисунок 1.16). Таким образом, ДНК-инсектициды, которые были применены в первых исследованиях на непарном шелкопряде, а также в экспериментах, которые составляют весомую часть данной диссертационной работы, представляют собой два оцДНК-фрагмента антиапоптозного гена IAP-3 ВЯП НШ длиной по 18 нт каждый. Однако, как будет показано в результатах диссертационного исследования, только антисмысловой oligoRING-фрагмент обладает значительным инсектицидным действием на непарного шелкопряда, проявляющееся в различных биологических эффектах на насекомом (увеличение смертности, снижение биомассы, уменьшение количества самок в поколении, увеличение содержания кальция и магния в тканях, снижении экспрессии антиапоптозных генов, конденсация и фрагментация ядерного материала, а также

уменьшение объёма клеток), которые сопровождают его до следующей генерации (яйца насекомого) включительно.

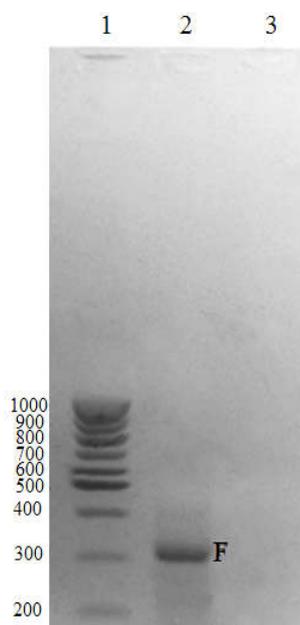


Рисунок 1.16 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК вируса ядерного полиэдроа непарного шелкопряда: 1 – маркер молекулярных масс ДНК длиной от 200 до 1000 п.н.; 2 – ДНК вируса, выделенная из препарата "ВИРИН НШ" (Россия); 3 – контроль; F – фрагмент вирусной ДНК длиной 317 п.н.

Основная идея применения антисмыслового oligoRING-фрагмента – это вызвать апоптоз клеток насекомого и его последующую гибель. Все клетки многоклеточных, а также все исследованные клетки простейших обладают способностью претерпевать апоптоз при соответствующих условиях (Portt et al., 2011). Так как антиапоптозные гены были получены вирусами от хозяев (Hughes, 2002), микропатогены способны регулировать апоптоз во время инфекции путем экспрессии белков, которые могут ингибировать активацию и/или активность каспаз, включая белки-ингибиторы апоптоза (IAP), а также ингибитор каспазы P35 и родственных ему белков. Поэтому можно сделать вывод, что антиапоптозные белки бакуловирусов, имеющих клеточное происхождение, являются ключевым противовесом апоптотическим белкам в клетках, ингибируя их путём прямого белок-белкового взаимодействия и сдерживая их активацию.

Другими словами, IAP-белки представляют собой мощный механизм контроля для предотвращения неуместной активации каспаз в клетках, которые должны жить, и, по-видимому, некоторые IAP-белки играют критическую роль в этом отношении. Для микропатогена это имеет колоссальное адаптивное значение. Апоптоз может быть чрезвычайно мощным ответом на бакуловирусную инфекцию, снижая репликацию вируса, инфекционность и способность вируса распространяться в организме насекомого, даже если начало инфекции развивалось успешно. Апоптоз особенно эффективен, когда он сочетается с другими врожденными противовирусными средствами защиты, которые на сегодняшний день практически не изучены у насекомых (Clem, 2005). Отключение при помощи антисмысловых олигонуклеотидов антиапоптозных генов как в безвирусном насекомом, так и совместное отключение антиапоптозных генов насекомого и вируса в заражённых клетках хозяина, должно сдвигать биохимические реакции клетки в сторону апоптоза.

Апоптоз является морфологическим явлением (Рисунок 1.17). Характерные признаки апоптотической клетки включают конденсацию хроматина (пикноз) и фрагментацию ядра (кариорексис), блеббинг плазматической мембраны и уменьшение клетки в объёме. В итоге клетки распадаются на мелкие фрагменты, окруженные мембраной (апоптотические тела), которые очищаются фагоцитозом, не вызывая воспалительный ответ. Активация семейства внутриклеточных цистеиновых протеаз, которые расщепляют свои субстраты в месте нахождения остатков аспарагиновой кислоты, известных как каспазы, вызывает морфологические изменения в клетке, называемые апоптозом (Reed, 2000)

Одним из характерных проявлений апоптоза в клетках является формирование апоптотической "ДНК-лестницы", кратной 180-200 п.н. Расщепление хромосомной ДНК на фрагменты олигонуклеосомного размера является биохимическим признаком апоптоза и осуществляется дезоксирибонуклеазами, активируемыми каспазами. Обширные морфологические и биохимические изменения во время апоптоза, вероятно, гарантируют, что

умирающие клетки оставят минимальное воздействие на соседние ткани *in vivo* (Zhang, 2000).

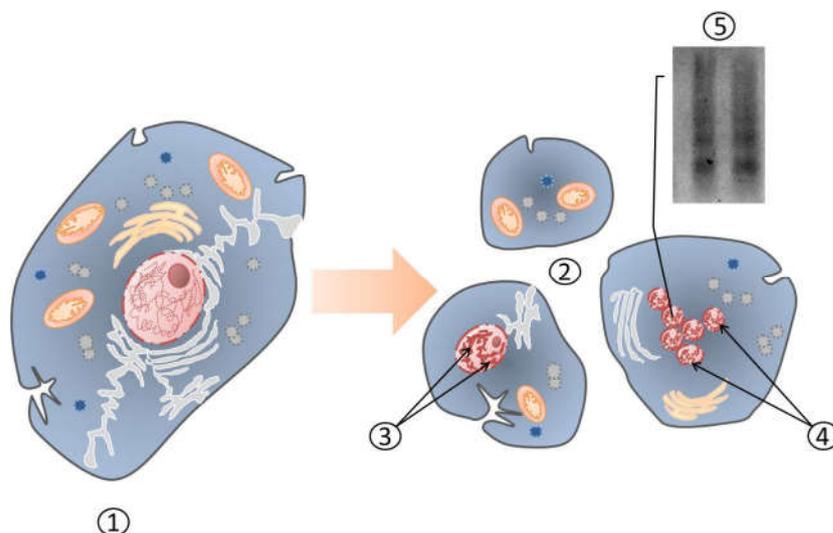


Рисунок 1.17 – Процессы в клетке, претерпевающей апоптоз: 1 – нормальная клетка; 2 – апоптотические тела; 3 – конденсация хроматина (пикноз); 4 – фрагментация ядра (кариорексис); 5 – формирование апоптотической "ДНК-лестницы"

При использовании антисмысловых олигонуклеотидов антиапоптозных генов в качестве ДНК-инсектицидов против целевого насекомого-вредителя именно заблокированная экспрессия целевого антиапоптозного гена будет инициировать апоптотический сигнал в клетке путем блокировки синтеза определённого антиапоптозного белка. В результате этого определённая часть апоптозных белков не будет ингибироваться путём белок-белкового взаимодействия антиапоптозными (IAP) белками и произойдет их активация, что приведёт к запуску апоптотических процессов в целевом насекомом-вредителе. В самом простейшем случае, антисмысловые ДНК-фрагменты можно растворять в воде и применять контактно на целевом насекомом-вредителе, применяя генераторы холодного тумана и ранцевые опрыскиватели в условиях поля, а также ручные пульверизаторы в лабораторных условиях. Большинство экспериментов, представленных в данной диссертационной работе, было

проведено с ДНК-инсектицидами, разработанными против непарного шелкопряда и протестированных на его гусеницах младших возрастов.

### 1.10 Непарный шелкопряд как листогрызущее насекомое

Непарный шелкопряд (*Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriinae)), являясь полифагом, относится к числу серьезных вредителей древесных и кустарниковых пород растений (Воронцов, 1982) (Рисунок 1.18). Повреждение лесных насаждений гусеницами непарного шелкопряда в России и Украине известны со второй половины XIX в. (Киреева, 1983). Периодические вспышки массового размножения непарного шелкопряда наблюдаются ежегодно в тех или иных частях его ареала. Довольно часто они носят местный характер и образуются на небольших площадях, иногда же распространяются на огромных пространствах, захватывая несколько ландшафтно-географических зон. В лесных массивах Крыма гусеницы непарного шелкопряда повреждают все породы деревьев, отдавая предпочтение дубу пушистому *Quercus pubescens* и грабу восточному *Carpinus orientalis*, в садах – яблоне домашней *Malus domestica* и груше *Pyrus communis*. Каждое насекомое способно уничтожить около 1 м<sup>2</sup> листвы за время своей личиночной стадии развития (Chen et al., 2013; Grayson et al., 2015). Вспышки численности непарного шелкопряда могут приносить значительные экономические потери лесам Европы, Азии, Африки, Северной Америки (Alalouni et al., 2013) и даже Новой Зеландии (Pitt et al., 2004). При массовом размножении гусеницы почти полностью объедают листья деревьев, нередко вынужденно переходят на травянистые растения – повреждают хлебные злаки и даже овощные культуры. В Крыму наблюдались вспышки эпидемии непарного шелкопряда с полным уничтожением зеленой массы шиповника, можжевельника, сосны крымской (Шестопапов, 2011).

Широкому распространению непарного шелкопряда способствует легкость, с которой он адаптируется к различным экологическим условиям: большая

биологическая пластичность, высокая плодовитость, возможность быстрого расселения гусениц I возраста с ветром и другие эколого-физиологические особенности (Киреева, 1983; Petrovskii, 2010).



Рисунок 1.18 – Гусеница непарного шелкопряда 1-го возраста на листе дуба

Биологическая регуляция численности непарного шелкопряда основана на использовании бакуловирусных препаратов на основе ВЯП НШ (Бахвалов, 2001). Применение бакуловирусных препаратов в борьбе с насекомыми-вредителями лесного и сельского хозяйства, в том числе с непарным шелкопрядом, не всегда является успешным. Объясняется это тем, что возникновение искусственной эпизоотии зависит не только от экологических, но и генетических факторов, в частности, генетической устойчивости к микропатогену. Размножение начинается обычно в дубовых лесах, поскольку дуб является кормовым растением, обеспечивающим наибольшую плодовитость этого вредителя. Общеизвестно, что непарный шелкопряд является одним из важнейших звеньев в общей цепи причин массового усыхания дубрав (Воронцов, 1982). В результате уничтожения листьев происходит уменьшение прироста древесины, потеря урожая текущего года, резкое снижение урожая следующего года из-за недостатка пластических веществ для закладки почек и гибель деревьев (Petrovskii, 2010). На территории России за последние 20 лет площадь очагов непарного шелкопряда в среднем ежегодно составляла 726 тыс. га (Ильиных, 2007), что, для сравнения, составляет около 27% территории Республики Крым. Благодаря способности быстро

размножаться непарный шелкопряд наносит большой ущерб лесам, растительности вдоль ручьев и рек. В связи с этим имеется постоянная необходимость использования эффективных и безопасных инсектицидов для контроля численности непарного шелкопряда. На рынке появляется довольно много новых инсектицидов для контроля численности непарного шелкопряда. Чаще всего в борьбе с непарным шелкопрядом применяют пиретроиды, фосфорорганические соединения, карбаматы, ингибиторы синтеза хитина, неоникотиноиды. Нужно отметить, что ДНК-инсектициды являются единственным препаратом на основе нуклеиновых кислот, который на данный момент разрабатывается для регуляции численности непарного шелкопряда.

Таким образом, в последнее десятилетие наблюдается повышенное внимание к области разработки инсектицидов на основе фрагментов нуклеиновых кислот, в частности одноцепочечных ДНК-фрагментов (Оберемок, 2008а; Oberemok, 2018) и двухцепочечных РНК-фрагментов (Wang et al., 2011; Gu, 2013). Данные регуляторы численности насекомых-вредителей способны объединить в себе наилучшие качества современных инсектицидов: доступность и быстрое действие от химических агентов, а также избирательность от биологических препаратов. Технологии синтеза нуклеиновых кислот *in vitro* становятся всё менее затратными, что позволит в будущем сделать доступность ДНК-инсектицидов и РНК-препаратов сравнимой с доступностью химических инсектицидов.

Постгеномный подход в регуляции численности листогрызущих насекомых, основывающийся на применении антисмысловых олигонуклеотидов, имеет серьёзный потенциал быть коммерциализированным в ближайшем будущем. ДНК-инсектициды могут занять свою нишу на рынке современных препаратов для защиты растений после сертификации готового продукта. В доказательство этому в данной диссертационной работе будут рассмотрены вопросы, связанные с изучением биологических эффектов коротких одноцепочечных фрагментов антиапоптозных генов на листогрызущих насекомых и нецелевых организмов с целью создания эффективных ДНК-инсектицидов с высоким уровнем экологичности.

## РАЗДЕЛ 2

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 2.1 Происхождение гусениц непарного шелкопряда и других насекомых

Для проведения экспериментов были идентифицированы и собраны яйцекладки и гусеницы непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. в лесах Крымского полуострова, в 3-х основных локациях: близ г. Симферополя (шар. 44,93272419, долг. 34,03238297, вас. 302 м), г. Алушты (шар. 44,73612538, долг. 34,3751049, вас. 399 м) и г. Ялты (шар. 44,576835, долг. 34,31060314, вас. 269 м). Целью сбора гусениц из 3-х локаций была оценка средней чувствительности к ДНК-инсектицидам непарного шелкопряда крымской популяции. Часть яйцекладок непарного шелкопряда для исследований были любезно предоставлены к.б.н. Гниденко Ю.И. (Всероссийский научно-исследовательский институт лесоводства и механизации лесного хозяйства, г. Пушкино), а также д.б.н. Эрнэ Э.А. (Университет Франсуа Рабле, г. Тур, Франция). Яйцекладки шелкопряда-монашенки *Lymantria monacha* L. были любезно предоставлены к.б.н. Гниненко Ю.И. (Всероссийский научно-исследовательский институт лесоводства и механизации лесного хозяйства, г. Пушкино, Россия). Яйцекладки и гусеницы каролинского бражника *Manduca sexta* L., совки-ипсилон *Agrotis ipsilon* Hufnagel, металловидки серой *Trichoplusia ni* Hübner были любезно предоставлены д.б.н. Эрню Э.А. (Университет Франсуа Рабле, г. Тур, Франция).

Гусеницы самшитовой огнёвки *Cydalima perspectalis* Walker были собраны самостоятельно на кустарниках самшита *Buxus sempervirens* L. на территории Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского и Парка культуры и отдыха имени Юрия Гагарина г. Симферополя.

Личинки колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say были собраны самостоятельно на модельных участках с картофелем обыкновенным *Solanum tuberosum* L. близ г. Симферополя.

Имаго амбарного долгоносика *Sitophilus granarius* L. были собраны самостоятельно на одной из мельниц Бахчисарайского района.

Личинки комара обыкновенного *Culex pipiens* L. были собраны самостоятельно в мелких водоёмах Бахчисарайского района.

Имаго дикого типа плодовой мушки *Drosophila melanogaster* Meigen из г. Тур, (Франция) были любезно предоставлены Эрню Э.А. (Университет Франсуа Рабле, г. Тур, Франция). Линии ebony и white плодовой мушки *D. melanogaster* были любезно предоставлены сотрудниками кафедры экологии и зоологии Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Имаго дикого типа дрозофилы из г. Симферополя были собраны самостоятельно.

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).

## 2.2 Выращивание насекомых в лабораторных условиях

Всех насекомых в лаборатории выращивали при температуре 25-27 °С. Гусениц непарного шелкопряда *L. dispar*, шелкопряда-монашенки *L. monacha*, каролинского бражника *M. sexta*, совки-ипсилона *A. ipsilon* и металловидки серой *T. ni* выращивали в чашках Петри на приготовленной самостоятельно питательной среде со следующим составом (на 0,5 л воды):

1. агар-агар – 10,85 г;
2. кукурузная мука – 60 г;
3. пивные дрожжи – 16 г;
4. 3-дневные проростки пшеницы – 17,75 г;

5. бензойная кислота – 0,65 г;
6. аскорбиновая кислота – 2,25 г;
7. формальдегид – 0,6 мл;
8. нипагин – 0,75 г;
9. вода – 500 мл.

Кроме этого, в весенне-летний период гусениц непарного шелкопряда выращивали на свежих листьях дуба пушистого *Quercus pubescens* Willd. и дуба черешчатого *Quercus robur* L.

Личинок *D. melanogaster* выращивали в пластиковых контейнерах объёмом 100 мл на питательной среде со следующим составом:

1. агар-агар – 32 г;
2. пивные дрожжи – 12 г;
3. манка – 18 г;
4. сахар – 18 г;

Гусениц самшитовой огнёвки выращивали в чашках Петри на листьях самшита *Buxus sempervirens* L.

Личинок колорадского жука выращивали в пластиковых контейнерах объёмом 100 мл на листьях картофеля *S. tuberosum* L.

Имаго амбарного долгоносика выращивали в 0,5 л стеклянных банках на зёрнах пшеницы *Triticum aestivum* L.

Личинки комара обыкновенного *Culex pipiens* L. выращивали в пластиковых контейнерах объёмом 100 мл на сухой перетёртой дафнии (10-20 мг в сутки/контейнер) при температуре 25-27 °С в растворе со следующим составом:

1. хлористый кальций – 0,25 г;
2. хлористый калий – 0,35 г;
3. хлористый натрий – 7,5 г.

(Перемешать в 1 л дистиллированной воды).

### **2.3 Взвешивание насекомых**

Лабораторные весы Axis BTU-210 (Польша) с дискретностью 1 мг, а также торсионные весы ВТ-500 (СССР) были использованы для взвешивания личинок, куколок, имаго и яйцекладок насекомых. Перед началом экспериментов по контактной обработке ДНК-олигонуклеотидами особи насекомых были рандомизированы и взвешены, чтобы достичь одинаковой стартовой точки в биомассе (разница в группах эксперимента находилась в пределах 3% по сравнению с контролями).

### **2.4 Дизайн олигонуклеотидов**

Дизайн ДНК-олигонуклеотидов (ДНК-инсектицидов и праймеров) был осуществлён самостоятельно на основе геномных последовательностей насекомых и вирусов ядерного полиэдроза, имеющих в базе данных ICTV (<http://www.ictvonline.org>), а также в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). ДНК-олигонуклеотиды со степенью очистки HPLC были синтезированы фирмой "Metabion International AG" (Германия), а также ЗАО "Евроген РУ" (Россия) и на собственном ДНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) без очистки HPLC.

### **2.5 Обработка насекомых ДНК-олигонуклеотидами**

Личинки или имаго насекомых были использованы для контрольных и экспериментальных групп. Насекомых обрабатывали путём пульверизации либо одиночного капельного нанесения водного раствора с одноцепочечным фрагментом ДНК в концентрации от 3 до 30 пмоль/личинку. Пипеточным дозатором наносили каплю раствора на середину дорсальной части тела личинки, что соответствует приблизительно III-V сегментам брюшка (Рисунок 2.1). В

случае капельного нанесения раствора следили, обычно в течение 20-30 минут, чтобы личинка не стряхнула каплю, пока капля не исчезала полностью.

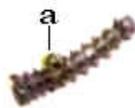


Рисунок 2.1 – Гусеница непарного шелкопряда 2-го возраста с каплей исследуемого раствора (а) на поверхности тела

В случае пульверизации осуществляли сбор пипеточным дозатором мелких капель с поверхности тела контрольных личинок, чтобы оценить количество ДНК-олигонуклеотида, попавшего на тело насекомого. Обработку ДНК-олигонуклеотидами проводили в пластиковых контейнерах объёмом 100 мл. Личинок металловидки серой *T. ni* и дрозофилы *D. melanogaster*, а также имаго амбарного долгоносика ввиду особенностей их анатомии и физиологии погружали в раствор с ДНК-фрагментами.

## 2.6 Заражение гусениц ВЯП НШ

Чтобы инфицировать гусениц непарного шелкопряда *L. dispar* был использован бакуловиральный препарат "Пинквир" (Россия), "Вирин НШ" (Россия) и "Вирин-ЭНШ" (Кыргызстан). Гусениц выращивали в течение 2-х суток на питательной среде, содержащей 10 000 вирусных полиэдров на 1 мг среды. После этого гусеницы были перенесены на безвирусную питательную среду. Фазово-контрастная микроскопия и камера Горяева (гематоцитометр) были использованы для подсчёта вирусных полиэдров в препарате. В некоторых экспериментах путём равномерного распределения дозы препарата на листе дуба черешчатого *Q. robur*, который съедался полностью определённым числом гусениц, достигалась более точная доза вирусных полиэдров, попавшая в кишечник насекомого.

## 2.7 Исключение и доказательство заражения непарного шелкопряда ВЯП

Для доказательства заражения непарного шелкопряда *L. dispar* ВЯП НШ, а также для его исключения в насекомых, была использована ПЦР со специфическими праймерами, которые отжигаются на последовательности гена капсида р39 ВЯП НШ: 5'-ACGTTCTCG TTGAACGTGCTG-3' (прямой праймер), 5'-CTGGTGAACCACAAAACCCTG-3' (обратный праймер) (Oberemok et al., 2016). ПЦР была проведена при помощи набора "Амплиценс-200-1" (Амплиценс, Россия) по инструкции. ДНК подверглась денатурации в течение 3 минут при 94 °С. После этого в течение 5 циклов соблюдался режим: 1 минута денатурации при 94 °С, 1 минута гибридизации при 61 °С и 1 минута элонгации при 72 °С. После этого последовало 30 циклов со следующим режимом: денатурация в течение 0,75 минут при 94 °С, гибридизация в течение 0,75 минут при 61 °С, элонгация в течение 0,75 минут при 72 °С. Далее проходила заключительная стадия элонгации при 72 °С в течение 5 минут. В ходе ПЦР, при наличии вирусной ДНК, данные олигонуклеотиды (праймеры) инициируют формирование ампликона длиной 524 п.н. Тот же протокол использовался для пары праймеров (5'-GCTGGTGGTCAACTG-3' – прямой праймер, 5'-CTCGTCGCACCGCAGG-3' – обратный праймер), инициирующих амплификацию ПЦР-продукта длиной 181 п.н. на гене полиэдрина ВЯП НШ.

## 2.8 Выращивание растений

Зёрна пшеницы *T. aestivum* замачивали в течение 16 часов в воде. Затем их проращивали на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри (50 семян на чашку) при температуре 25 °С в термостате в течение 2 суток. После этого проростки пересаживали в сосуды объёмом 0,5 л (по 25 растений на сосуд) на

питательный раствор Кнопа. Растения росли при постоянной температуре воздуха 23-25 °С и при освещении лампой дневного света в 10 клк.

Семена яблони домашней *Malus domestica* Borkh. стратифицировались при температуре 4 °С в течение 2-х недель и проращивались в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при температуре 25 °С в термостате в течение 20 суток. Затем проростки переносили в сосуды, содержащие раствор Хогланда-Арнона и растили при 12-часовом световом периоде с освещенностью 3,5 клк, температурой 25 °С и относительной влажностью 60%.

Для эксперимента на дубе черешчатом *Q. robur* было выбрано дерево высотой 5-6 метров в Ботаническом саду Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Для обработки ДНК-олигонуклеотидами были взяты отдельные ветви дерева.

Для экспериментов на картофеле обыкновенном *S. tuberosum* растения были выращены в горшках в лабораторных условиях из клубней растения. Для обработки ДНК-олигонуклеотидами были взяты листья отдельных растений.

## **2.9 Взвешивание растений**

Определение сухой массы растений проводили гравиметрическим методом. Растения разделяли на корни и надземную часть. После чего образцы фиксировали в течение 5 мин при 110 °С, высушивали при 60 °С до постоянного веса и определяли массу корневой системы и надземной части. О продуктивности растений судили по приросту биомассы в расчете на 1 растение.

## **2.10 Анализ содержания глюкозы и активности щелочной фосфатазы в растениях**

Активность щелочной фосфатазы и концентрация глюкозы в листьях дуба черешчатого и проростках яблони домашней определяли в полуавтоматическом

биохимическом анализаторе "BS-3000m" (Китай). Растительный материал (300 мг) измельчали в ступке с добавлением 500 мкл дистиллированной воды, а затем гомогенат центрифугировали при 2400 об/мин в течение 1 минуты на вортексе "MICROSPIN FV-2400" (BIOSAN, Латвия). 10 мкл супернатанта использовали для последующего анализа. С помощью наборов реагентов "Liquick Cor-ALP" и "Liquick Cor-Glucose" (PZ CORMAY S.A., Польша) по инструкции определяли уровень активности щелочной фосфатазы и концентрации глюкозы в гомогенате.

### **2.11 Выделение, амплификация ДНК и детекция продуктов амплификации**

ДНК выделяли с помощью набора "ДНК-сорб-АМ" (АмплиСенс, Россия) при использовании стандартного оборудования. Образцы, которые подлежали выделению ДНК, хранились в морозильной камере при температуре -20 °С. В большинстве случаев ДНК выделяли из свежего (незамороженного материала).

Порядок работы.

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок. Промаркировать пробирки.
2. Растереть пробы в ступке с добавлением 100 мкл дистиллята и перенести пробы по отдельным пробиркам.
3. Лизирующий раствор (если он хранился при 2-8 °С) прогреть при 65 °С до полного растворения кристаллов. В пробирки добавить по 300 мкл лизирующего раствора.
4. Пробы тщательно перемешать на вортексе "MICROSPIN FV-2400" и прогреть 5 мин при 65 °С. Процентрифугировать 15 с при 5 тыс. об/мин на центрифуге "MiniSpin" (Eppendorf, Германия). Если проба растворилась не полностью, процентрифугировать пробирку на центрифуге "MiniSpin" 5 мин при 12 тыс. об/мин и использовать для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенеся ее в новую пробирку.

5. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе "MICROSPIN FV-2400". В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 20 мкл ресуспендированного сорбента. Перемешать на вортексе "MICROSPIN FV-2400", поставить в штатив (планшет) на 2 минуты, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 минут.

6. Осадить сорбент в пробирках на центрифуге "MiniSpin" при 5 тыс. об/мин в течение 30 с. Удалить супернатант, используя дозатор с переменным объемом и меняя наконечник для каждой пробирки.

7. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки, перемешать на вортексе "MICROSPIN FV-2400" до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 10 тыс. об/мин на центрифуге "MiniSpin".

8. Удалить супернатант, используя дозатор с переменным объемом и меняя наконечник для каждой пробирки.

9. Повторить отмывку еще раз, следуя пункту 8., удалить супернатант полностью.

10. Поместить пробирки в термостат "Термит" (ДНК-технология, Россия) при 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента (сухой осадок приобретает цвет мела). При этом крышки пробирок должны быть открыты.

11. В пробирки добавить по 100 мкл TE-буфера для элюции ДНК. Перемешать на вортексе "MICROSPIN FV-2400". Переместить в термостат "Термит" при 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе "MICROSPIN FV-2400".

12. Процентрифугировать пробирки при 12 тыс. об/мин в течение 1 мин на центрифуге "MiniSpin ". Супернатант содержит очищенную ДНК, пробы готовы к постановке ПЦР.

Для проведения этапа амплификации ДНК использовали набор "АмплиСенс–200-1" (АмплиСенс, Россия).

Смешивание реактивов проводится в следующей пропорции:

1. смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов – 2,5 мкл;
2. 5-кратный реакционный буфер – 5 мкл;

3. сульфат магния – 1,5 мкл;
4. деионизованная вода – 3 мкл;
5. Taq-полимераза – 0,5 мкл;
6. минеральное масло – 11,5 мкл;
7. исследуемая выделенная ДНК – 5 мкл;
8. праймер – 1 мкл.

Порядок работы.

1. Промаркировать пробирки.
2. Смешать реактивы, исследуемую ДНК и праймер в пропорции, описанной выше. Процентрифугировать на вортексе "MICROSPIN FV-2400" в течение 1 минуты, чтобы на стенках пробирок не осталось реагентов.

3. Выбрать подходящую программу на амплификаторе, загрузить пробирки в амплификатор и запустить амплификацию.

4. По окончании амплификации можно приступить к детекции её продуктов.

Пробирки с амплифицированными фрагментами ДНК можно хранить при температуре 2-8 °С в течение двух недель.

Для этапа детекции продуктов амплификации использовались следующие химические вещества:

1. агароза;
2. маркер молекулярных весов;
3. бромистый этидий;
4. трис-боратный буфер 10X (трис-(оксиметил)-аминометан – 10,78 г; борная кислота – 5,503 г; ЭДТА, рН 8.0 – 4,384 мл; дистиллят – 86,3 мл; бромистый этидий – 5-15 мкл в концентрации 10 мг/мл.

Порядок работы.

1. Приготовить 1,8%-ный агарозный гель на основе трис-боратного буфера. Поместить его в камеру для электрофореза.

2. Залить гель трис-боратным буфером, содержащим бромистый этидий.

3. Нанести по 5 мкл каждой пробы с продуктами амплификации ДНК в отдельные лунки. Нанести в отдельную лунку маркер молекулярных весов ДНК.

4. Подключить камеру для электрофореза к источнику электрического питания (50 мА, 100 В) на 40-80 минут.

## 2.12 Выделение РНК

Выделение РНК проводили хлороформно-изопропанольным методом при помощи набора "ExtractRNA" (Евроген, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы, которые подлежали выделению РНК, хранились в морозильной камере при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Материал из некоторых экспериментов хранились под слоем раствора "IntactRNA" для предотвращения излишней деградации РНК.

Порядок работы.

1. Гомогенизировать образец в растворе "ExtractRNA (обычно около 200-400 мкл) в соответствии с рекомендацией для данного типа пробы.

2. Инкубировать лизат при комнатной температуре в течение 10-15 мин, чтобы произошла полная диссоциация нуклеопротеидных комплексов.

3. Центрифугировать лизат при 5300 об/мин на центрифуге "MiniSpin" в течение 10 мин для удаления нерастворенных фрагментов. Супернатант перелить в новую пробирку.

На поверхности лизата богатых жиром образцов может образовываться жировая пленка. При отборе супернатанта следует избегать попадания верхнего жирового слоя в новую пробирку.

Разделение фаз.

1. Добавить 0,2 мл хлороформа на каждый 1 мл реагента "ExtractRNA" добавленного на этапе гомогенизации.

2. Закрывать пробирку, активно перемешать содержимое пробирки с помощью встряхивания (вручную) в течение 15 секунд.

3. Инкубировать смесь в течение 3-5 минут при комнатной температуре, периодически встряхивая образец.

4. Держа пробирку наклонно (под углом 45°), аккуратно отобрать водную фазу, опасаясь касания интерфазы или органической фазы.

5. Переместить водную фазу в новую пробирку.

Экстракция РНК.

На этом этапе нужно соблюдать соответствующие меры предосторожности, чтобы избежать загрязнения препарата РНКазами.

1. Добавить в водную фазу 0,5 мл изопропанола на каждый 1 мл реагента, использованного для гомогенизации.

2. Инкубировать смесь при комнатной температуре в течении 10 мин.

3. Центрифугировать образец при 13400 об/мин на центрифуге "MiniSpin" в течение 10 мин при комнатной температуре (понижение температуры может привести к выпадению солей в осадок).

4. Тщательно отобрать супернатант, оставив осадок РНК на дне пробирки (осадок РНК может быть невидимым).

5. Аккуратно, по стенке пробирки, добавить 2 мл 75% этанола на каждый 1 мл изопропанола. Образцы в этаноле могут храниться при – 20 °С и ниже в течение нескольких лет.

6. Образец центрифугировать при 13400 об/мин на центрифуге "MiniSpin" в течение 5 минут при комнатной температуре.

7. Удалить этанол.

8. Высушить осадок на воздухе в пробирке с открытой крышкой в течение 5-7 мин. Не оставлять высохший образец на воздухе слишком долго, так как пересохший осадок РНК плохо растворяется в воде. Не использовать для сушки подогрев или вакуумное центрифугирование (Speed vac).

9. Растворить РНК в необходимом объеме свободной от РНКаз воды. Перемешать раствор пипетированием для лучшего растворения осадка. Встряхнуть раствор на вортесе (для улучшения растворения образец рекомендуется прогреть при 55-60 °С в течении 3-5 минут).

Качество и концентрацию экстрагированной суммарной РНК оценивали с помощью NanoDrop™ (Thermo Scientific, США). Для получения кДНК использовали одинаковую концентрацию РНК (в среднем 3 мкг) для разных групп эксперимента.

### **2.13 Обратная транскрипция**

Для обратной транскрипции, общую РНК (3 мкг) смешивали с праймером oligodT (18) и применяли набор "MMLV RT" (Евроген, Россия) по инструкции производителя. Обратную транскрипцию проводили при 40 °С в течение 60 мин в термостате "Термит". После этого для инактивации обратной транскриптазы смесь выдерживали при 70 °С в течение 60 мин в термостате "Термит".

### **2.14 Секвенирование ДНК**

ПЦР-продукты были очищены при помощи набора "NucleoSpin Extract II" (Macherey-Nagel, Франция) и секвенирующая полимеразная реакция была выполнена при помощи "Big Dye Terminator v3.1 RR-100 Mix" (Applied Biosystems, Франция). Полимеразные реакции были проведены с 5 мкл очищенной ДНК и 0,35 мкл праймеров (10 пмоль/мкл).

ДНК первоначально была денатурирована в течение 2-х минут при 96 °С, после этого последовал следующий режим: 30 циклов по 10 секунд денатурации при 96 °С, 15 секунд гибридизации при 50 °С, и 4 минуты элонгации при 60 °С. Ампликоны были секвенированы в обоих направлениях при помощи праймеров 5'-GCC GGC GGA ACT GGC CCA-3' (прямой) и 5'-CGA CGT GGT GGC ACG GCG-3' (обратный) в капиллярном ДНК-секвенаторе "ABI PRISM 3100" (Applied Biosystems, Франция). ДНК была проанализирована при помощи программ "BLAST" (Zhang et al., 2000) и "ClustalW 2.0.3" (Thompson et al., 1994).

## 2.15 ПЦР в реальном времени (анализ экспрессии генов)

Для анализа экспрессии генов непарного шелкопряда использовали следующие праймеры: антиапоптозный ген IAP-1 – 5'-CGC TGC AAG TAA TGC TGA GG-3' (прямой), 5'-GCA CAC GCA ACT ACA TGT CC-3' (обратный); ген каспазы 4 – 5'-GCA GTC CAT CGC ACA GAA AC-3' (прямой), 5'-TGA TTA GCG TGG AGG TCG TG (обратный); ген актина 5'-GGA AGT TGC TGC GTT GGT AG-3' (прямой); 5'-TCC CAT TCC GAC CAT GAC AC-3' (обратный); антиапоптозный ген IAP-Z – 5'- AGG CCC GTG TCG CCG GTC-3' (прямой), 5'-CGA CGT GGT GGC ACG GCG-3' (обратный); ген, кодирующий 5,8S рибосомальную РНК – 5'-AAG AAA ACT ATT ACC CTG GAC G -3' (прямой), 5'-TGC GTT CGA AAT GTC GAT GTT C-3' (обратный). Набор "qPCRmix-HS SYBR" (Евроген, Россия) был использован для ПЦР в реальном времени по инструкции производителя. ПЦР-анализатор в реальном времени "LightCycler96" (Roche, Германия) был применён для проведения амплификации ДНК. Первоначально ДНК была денатурирована в течение 1 минуты при 95 °С, далее в течение 40 циклов последовал следующий режим: 10 секунд денатурации при 95 °С, 20 секунд отжига праймеров при 60 °С, 20 секунд элонгации цепи при 72 °С. Для анализа экспрессии гена рибулозобифосфаткарбоксилазы/оксигеназы (РуБисКО) в листьях картофеля обыкновенного *S. tuberosum* использовали следующие праймеры: 5'-TGA CAT CAC TTC CAT TG-3' (прямой), 5'-ACT САА СТТ ССТ ТАА GC-3' (обратный). Набор "qPCRmix-HS SYBR" (Евроген, Россия) был использован для ПЦР в реальном времени по инструкции производителя. ПЦР-анализатор в реальном времени "LightCycler96" (Roche, Германия) был применён для проведения амплификации ДНК. ДНК первоначально была денатурирована в течение 1 минуты при 95 °С, далее в течение 40 циклов последовал следующий режим: 10 секунд денатурации при 95 °С, 20 секунд отжига праймеров при 50 °С, 27 секунд элонгации цепи при 72 °С. ПЦР-продукты подверглись плавлению, чтобы оценить специфичность амплификации.

## 2.16 Гистологические исследования

Гусеницы фиксировались в 10%-ном нейтральном забуференном формалине в течение 2-х суток. Объем фиксирующей жидкости в 20 раз превышал объем фиксируемого объекта. Общее время фиксации при комнатной температуре (около 20 °С) было не менее 24 часов. Гусеницы обезвоживались и пропитывались парафином по общепринятой стандартной методике. Гистологическая проводка осуществлялась с помощью готового раствора "IsoPREP" (БиоВитрум, Россия), являющегося абсолютизированным изопропанолом 99,7%-ной концентрации с добавкой оксилфеноксиполиэтоксиэтанола (Тритон X15) в соотношении 1:10000. Для пропитывания обезвоженной ткани и приготовления блоков применяли среду "HISTOMIX" (БиоВитрум, Россия). Использовали следующий протокол гистологической проводки: 4 смены раствора "IsoPREP" (время экспозиции в каждой смене составил 1 час); 2 смены раствора "IsoPREP" (время экспозиции в каждой смене составил 1 час 30 мин); 2 смены "HISTOMIX" (время экспозиции в каждой смене составил 1 час); 2 смены "HISTOMIX" (время экспозиции в каждой смене составил 2 часа).

С использованием ротационного микротомы "Ротмик" (Россия) изготовили срезы толщиной не более 4 мкм, которые в дальнейшем депарафинировали, гидратировали, окрашивали гематоксилином и эозином (БиоВитрум, Россия), а затем погружали в окончательную среду для сохранения секций (Блик, Россия).

## 2.17 Детекция апоптотической "лестницы ДНК"

Для детекции апоптотической "лестницы ДНК" в насекомых был применён по инструкции набор "Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit" (Life Technologies, США). Визуализацию апоптотической "лестницы ДНК"

осуществляли в 1 %-ном агарозном геле с использованием бромистого этидия и трансиллюминатора.

### **2.18 Измерение кальция и магния в тканях яиц насекомого**

Измерения ионов кальция и магния в тканях яиц насекомого проводили согласно стандартному протоколу ГОСТ 23268.5-78. Предварительно ткани яиц насекомого были обуглены до пепла при температуре 450 °С.

### **2.19 Определение количества погибших клеток в исследуемой популяции стволовых клеток быка домашнего**

Для выделения мезенхимных стволовых клеток костного мозга быка домашнего *Bos taurus taurus* L. использовали метод, разработанный Косовским (2009). Для устранения контаминации первичных культур мезенхимальных стволовых клеток в среду ДМЕМ (ПанЭко, Россия) добавляли 10-кратное количество антибиотиков-антимикотиков (Sigma-Aldrich, США). Клеточную суспензию предварительно фильтровали через стерильные нейлоновые фильтры с диаметром пор 100 мкм, наслаивали на фиколл (1,077 г/мл) в соотношении 1:1, затем центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 минут до образования на границе раздела фаз белесоватого кольца из мононуклеарных клеток костного мозга. Данную суспензию промывали от фиколла путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5 минут в растворе Версен-ЭДТА (ПанЭко, Россия). К осадку добавляли ростовую среду ДМЕМ с глютамином и 10%-ный раствор фетальной сыворотки коров (HyClone, США) вместе с разбавленным в 100 раз раствором антибиотиков-антимикотиков.

Культивирование мезенхимальных стволовых клеток костного мозга проводили в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С по общепринятой методике (Косовский, 2009; Косовский и др., 2014). Культуральную среду (ДМЕМ с глютамином, 10%-

ный раствор фетальной сыворотки коров и 100-кратно разбавленный раствор антибиотиков-антимикотиков) меняли на 2-3 сутки культивирования. Длительность культивирования мезенхимальных стволовых клеток составляла от 1-2 до 5-6 недель. По достижении монослоя клетки пассировали или же сохраняли путем криоконсервирования в 1,5 М растворе диметилсульфоксида (Sigma-Aldrich, США) с фетальной сывороткой коровы. Для оценки морфологии клеток использовали инвертированный микроскоп (Nikon, Япония), автоматическую биостанцию (Nikon, BioStation IMq, Япония) с программным обеспечением режимов и параметров культивирования клеток теплокровных, а также клеточный сортер Sony SH800 Z (Sony Biotechnology Inc., Япония). Для определения количества клеток использовали камеру Горяева.

С целью оценки цитотоксичности oligoRING-фрагмента мезенхимальные стволовые клетки быка домашнего были трансфицированы по инструкции производителя при помощи Lipofectamine® (Invitrogen, США) в концентрации 1 фемтомоль ДНК-олигонуклеотида (около 6 пкг) на клетку. В качестве контрольного ДНК-олигонуклеотида был использован фрагмент 5'-СТССАГАТТСССААСАСС-3' антиапоптозного гена IAP-2 быка домашнего. Клетки высевали на 24-луночные планшеты в концентрации 30 000 клеток/мл и культивировали в среде ДМЕМ с 2 мМ L-глутамина и 10% фетальной сыворотки коров при +37 °С с 5% CO<sub>2</sub> в атмосфере (Nuairе Autoflow IR Direct Heat CO<sub>2</sub>-incubator, США), количество клеток в среде подсчитывали в камере Горяева.

На 12-е сутки после трансфекции клетки были трипсинизированы, и доля погибших стволовых клеток быка домашнего *B. taurus taurus* была оценена при помощи окрашивания реактивом Хёкста 33342 (все клетки) против иодида пропидия (погибшие клетки). Регистрацию сигналов осуществляли в клеточном сортере Sony SH800 Z (Sony Biotechnology Inc., Япония).

## 2.20 Анализ масла мяты перечной методом газовой хроматографии

Корни мяты перечной *Mentha piperita* L. длиной по 10-15 сантиметров укладывали в прямоугольные горшки (40x15x12 см) в универсальный торфяной грунт (азот 170 мг/л, фосфор 160 мг/л, калий 270 мг/л, pH не менее 5,5). Растения выращивали в тепличных условиях на протяжении двух месяцев. После этого провели обработку растений водным раствором антисмыслового олигонуклеотида "oligoMER-11" (5'-АСАСТСТТТТГ-3') и контрольного oligoYM-фрагмента (5'-СГТАСГТАСГТ-3') с помощью генератора холодного тумана BURE SM B10 (Южная Корея) в концентрации 200 нг/мкл (50 пмоль/см<sup>2</sup> листа). Через 96 часов надземная часть растений была срезана. В колбы объемом 1000 мл помещались по 100 грамм свежих листьев и 600 мл дистиллированной воды. Отгонку эфирного масла проводили на аппарате Клевенджера в течение 60 минут. Компонентный состав эфирного масла анализировали на газовом хроматографе "Хроматэк-Кристалл 5000.2" (Россия) с пламенно-ионизационным детектором.

## 2.21 Обнаружение олигонуклеотида oligoRIBO-11 методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ)

Гусеницы непарного шелкопряда II возраста (10-11 мг) при помощи дозатора были обработаны контактно oligoRIBO-11-фрагментом в концентрации 1 нмоль/мкл. Были нанесены 3 капли по 0,3 мкл каждая на переднюю, среднюю и заднюю дорсальную часть тела каждого насекомого. Таким образом на каждую гусеницу попало 0,9 нмоль ДНК-фрагмента. Контрольная группа была обработана аналогичным образом с использованием дистиллированной воды. После этого ждали 20 минут до исчезновения капли на поверхности тела. После этого измеряли 30, 60 и 90 минут соответственно для разных вариантов эксперимента и проводили отмывку гусениц. Анализ всех образцов, включая контроль, был проведён после семи отмывок гусениц в воде и 70%-ном растворе

спирта (вода-спирт-вода-спирт-вода-спирт-вода). Каждая отмывка занимала 15 секунд (гусеница полностью погружалась в раствор) при помощи лёгких встряхивающих движений. После этого гусениц гомогенизировали в 200 мкл воды и центрифугировали 1 минуту при 10 000g. Надосадочную жидкость (100 мкл) помещали в термостат на 60 минут при 80 °С. Надосадочную жидкость использовали для исследования методом МАЛДИ.

В качестве матрицы для МАЛДИ использовалась 3-гидроксипиколиновая кислота (3-НРА-матрица).

Методика приготовления 3-НРА-матрицы.

1. В пробирке смешать по 50 мкл бидистиллированной воды и ацетонитрила.

2. Добавить 3-НРА-матрицу до создания насыщенного раствора и оставить на ночь в шейкере над минимальным количеством кристаллов (раствор А).

3. Приготовить 0,1 М раствор (10X) дигидроцитрата аммония (раствор Б).

4. В отдельную пробирку перенести раствор А без осадка (100мкл) и добавить к нему 10 мкл раствора Б.

Пробоподготовка образцов.

Использовать растворы образцов олигонуклеотидов с концентрацией 50-100 пмоль/мкл. С минимальным количеством солей в растворе. Для анализа олигонуклеотидов наиболее подходящими растворителями являются вода и ацетонитрил.

Нанесение образцов на мишень прибора.

1. Подсушить мишень при 80 °С 10-15 мин.

2. Подождать пока мишень остынет.

3. В ячейки мишени нанести по 0,5 мкл матрицы.

4. Подождать высыхания и образования пятна из матрицы.

5. Нанести по 0,5-0,7 мкл образцов.

6. Высушить 15-30 мин.

7. Загрузить мишень через камеру загрузки образцов в вакуумную камеру.

8. Подождать стабилизации (постоянное значение) вакуума внутри камеры (меньше  $10^{-6}$  бар) и произвести измерения.

Измерения проводились на масс-спектрометре Bruker Microflex MALDI-TOF (Bruker, США) с использованием лазера LTB MNL 100 (106 PD) V002.61 (LTB Lasertechnik Berlin, Германия).

## **2.22 Обнаружение проникновения oligoRIBO-11-фрагмента и oligoRING-фрагмента методом спектрофотометрии**

По 20 гусениц непарного шелкопряда II возраста (15-16 мг) при помощи дозатора были обработаны контактно 1 мкл oligoRIBO-11-фрагментом и 1 мкл oligoRING-фрагментом в концентрации 326,3 нг/мкл и 620,1 нг/мкл соответственно. Контрольная группа была обработана аналогичным образом с использованием дистиллированной воды. На место высохшей капли через 90 минут наносили 1 мкл дистиллированной воды, ждали 30 секунд, каплю собирали и анализировали на спектрофотометре NanoDrop<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific, США). Чтобы исключить наличие дезоксирибонуклеаз на поверхности тела гусеницы, из-за которых могло произойти снижение концентрации ДНК-олигонуклеотидов, собранные с поверхности тела гусеницы капли выдерживали при комнатной температуре ещё 90 минут. Концентрация олигонуклеотидов после этого менялась в пределах 5%.

## **2.23 Статистический анализ**

В зависимости от ситуации были применены параметрический тест Стьюдента и непараметрические хи-квадрат критерий Пирсона с поправкой Йетса. Статистические расчёты были проведены на базе компьютерных программ STATISTICA 7.0 и Excel 2010. Эксперименты имели от 3 до 9 повторностей. В графиках и таблицах обозначены средние и стандартные ошибки средних.

### РАЗДЕЛ 3

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

Одним из самых значимых результатов данной работы стало обнаружение инсектицидного действия короткого антисмыслового oligoRING-фрагмента из консервативного RING-домена антиапоптозного IAP-3-гена вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) на его хозяина – непарного шелкопряда (НШ). Были изучены уровень смертности насекомого, снижение его биомассы, частота формирования самок, жизнеспособность яиц шелкопряда и содержание в них кальция и магния. Кроме этого, была отработана возможность создания ДНК-инсектицидов на основе IAP-генов против других насекомых-вредителей – металлоидки серой и комара обыкновенного, а также модельного объекта – дрозофилы.

### 3.1 Повышение смертности насекомого

Инсектицидный эффект oligoRING-фрагмента наблюдался при контактном попадании на гусеницу I-II возраста 3 пмоль олигонуклеотида. Была исследована динамика смертности безвирусных гусениц непарного шелкопряда, которые были собраны в природе с 3-х модельных участков (близ Симферополя, Ялты и Алушты – 2 повторности) и обработаны в лаборатории водным раствором, содержащим oligoRING-фрагмент, водой (контроль) и контрольным oligoA-фрагментом (Рисунок 3.1). 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" ( $\chi^2=6,8$ ;  $df=1$ ;  $N=162$ ;  $p<0,05$ ).

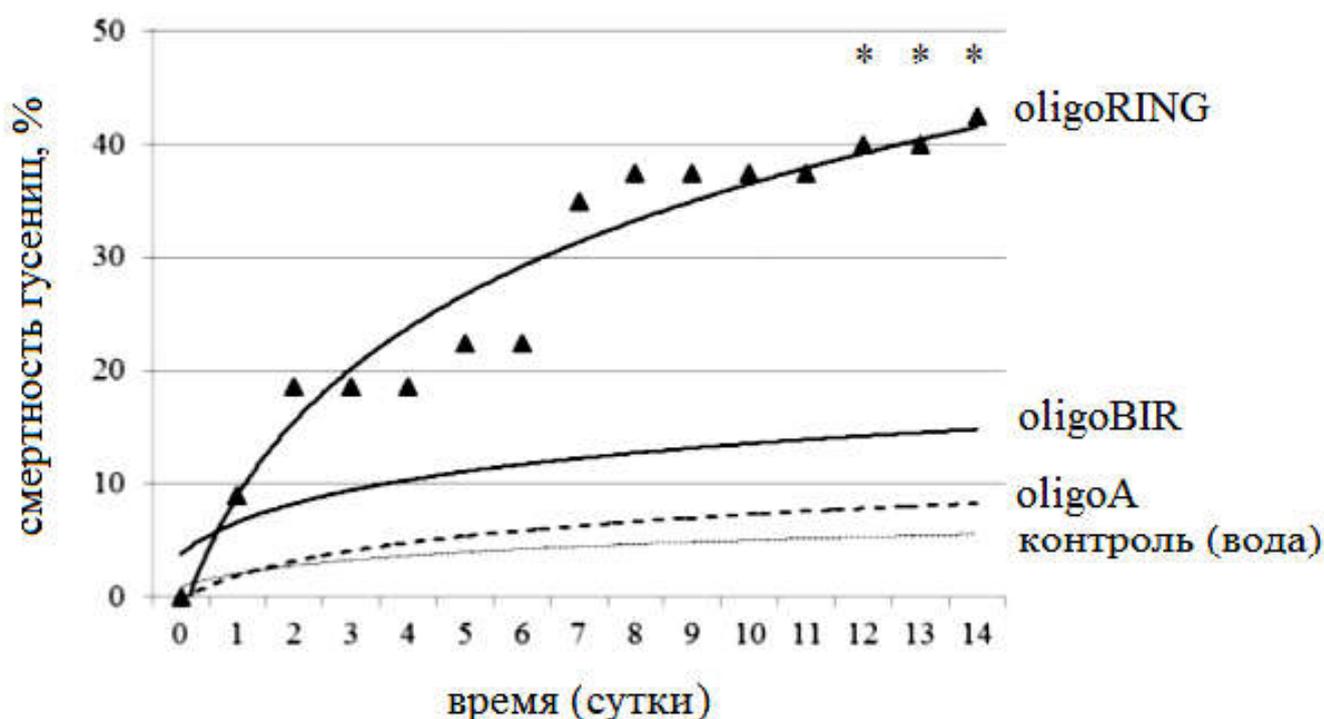


Рисунок 3.1 – Динамика смертности гусениц непарного шелкопряда после их контактной обработки водой и ДНК-олигонуклеотидами: oligoRING-фрагментом (ДНК-инсектицид; антисмысловый фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ; 5'-CGA CGT GGT GGC ACG GCG-3'), oligoBIR-фрагментом (контрольный фрагмент; смысловой фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ; 5'-GCC GGC GGA ACT GGC CCA-3'), oligoA-фрагментом (контрольный фрагмент; 5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA-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 р39 ВЯП НШ (подраздел 2.7) (Рисунок 3.2). Эксперимент был проведён в 4-х повторностях по 20-30 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

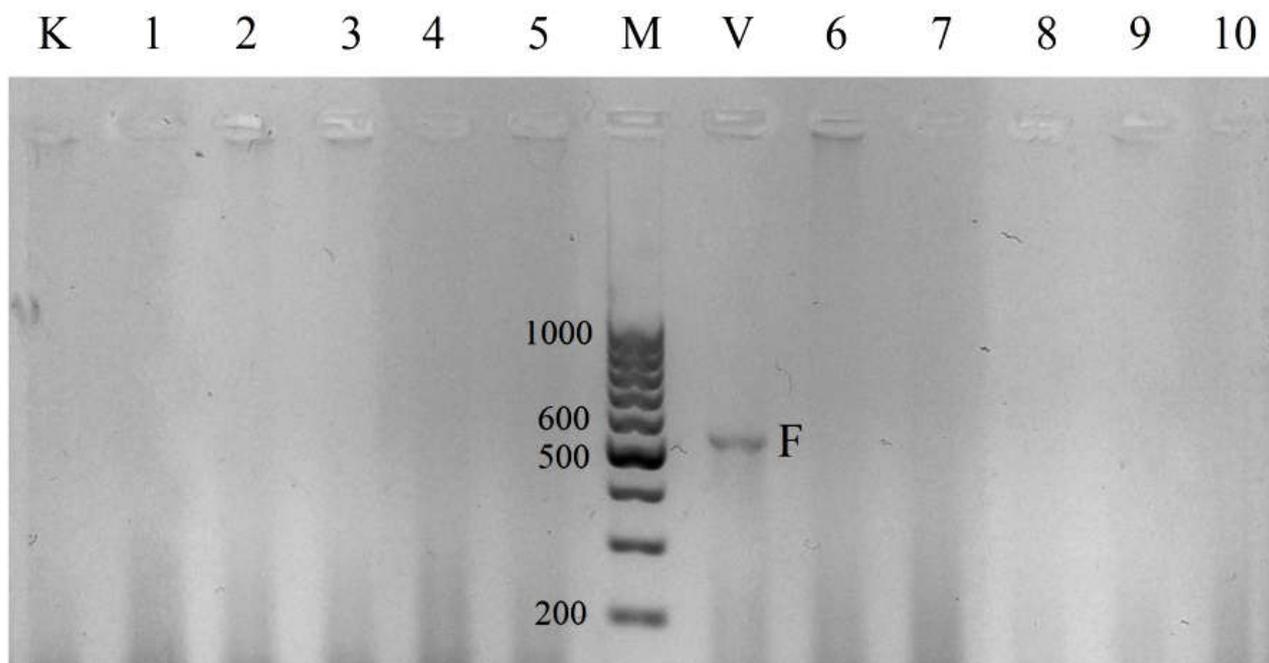


Рисунок 3.2 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК непарного шелкопряда, полученных с использованием праймеров к гену капсида р39 для детекции ДНК ВЯП НШ (подраздел 2.7): К – контроль; М – маркер молекулярных весов ДНК (1 кб); 1-10 – индивидуальные электрофоретические спектры особей; V – (положительный контроль) с маркером вирусной ДНК длиной 524 п.н., ДНК вируса выделена из препарата "Вирин ЭНШ" (Кыргызстан)

Было также проанализировано совместное влияние oligoBIR-фрагмента и oligoRING-фрагмента на жизнеспособность гусениц непарного шелкопряда в концентрации 30 пмоль/гусеницу (по 15 пмоль каждого из олигонуклеотидов). Достоверное увеличение смертности безвирусных (Рисунок 3.3) гусениц непарного шелкопряда в группе "oligoBIR+oligoRING" по сравнению с контролем было обнаружено уже на 4-е сутки. Процент погибших гусениц продолжал расти вплоть до 11-го (последнего) дня эксперимента, достигнув в среднем 24,2% в группе "oligoBIR+oligoRING", 11,1% в группе "oligoA" и 8,2% в контрольной группе, обработанной водой. Статистический анализ с использованием  $\chi^2$ -критерия Пирсона выявил достоверно более высокий уровень смертности гусениц из группы oligoBIR+oligoRING на 11-е сутки эксперимента по сравнению с

контролем ( $\chi^2=6,68$ ;  $df=1$ ;  $N=136$ ;  $p<0,05$ ). Олигонуклеотид "oligoA" в концентрации 30 пмоль/гусеницу не оказал существенного инсектицидного действия на гусениц в четырех повторностях эксперимента. Нужно отметить, что смысловой фрагмент "oligoBIR" не "скрыл" инсектицидный эффект антисмыслового фрагмента "oligoRING" за счёт несовершенного спаривания с ним. Этот факт открывает возможность совместного использования сразу нескольких антисмысловых олигонуклеотидов, которые будут несовершенно комплементарными по отношению друг к другу и совершенно комплементарными к целевым РНК-мишеням.

Как правило, гусеницы из групп "oligoBIR+oligoRING" и "oligoRING", меньше питались, двигались медленнее, выглядели более обезвоженными и визуально были меньше гусениц из контрольной группы, что соответствует признакам апоптоза на клеточном уровне (Schliess, 2005) и на уровне организма (Hamshou et al., 2013). В экспериментах были использованы безвирусные гусеницы и это означает, что ответ на антисмысловой oligoRING-фрагмент был полностью под контролем генетического аппарата клеток насекомого. Таким образом, инсектицидный эффект oligoRING-фрагмента, который был обнаружен в данном исследовании, не зависит от заражения гусениц шелкопряда вирусом ядерного полиэдроза.

С разработанным oligoRING-инсектицидом также были проведены исследования в природных условиях в лесу близ с. Кулаково Тюменской области. Для данного эксперимента было отобрано 9 молодых деревьев (подроста) осины *Populus tremula* L. высотой 2-3 м. Были использованы по 3 дерева на каждую группу эксперимента: контрольная группа (вода), группа "oligoRING" и группа "oligoHB" (контрольный фрагмент; 5'-GCT GCA CCA CCG TGC CGC-3').

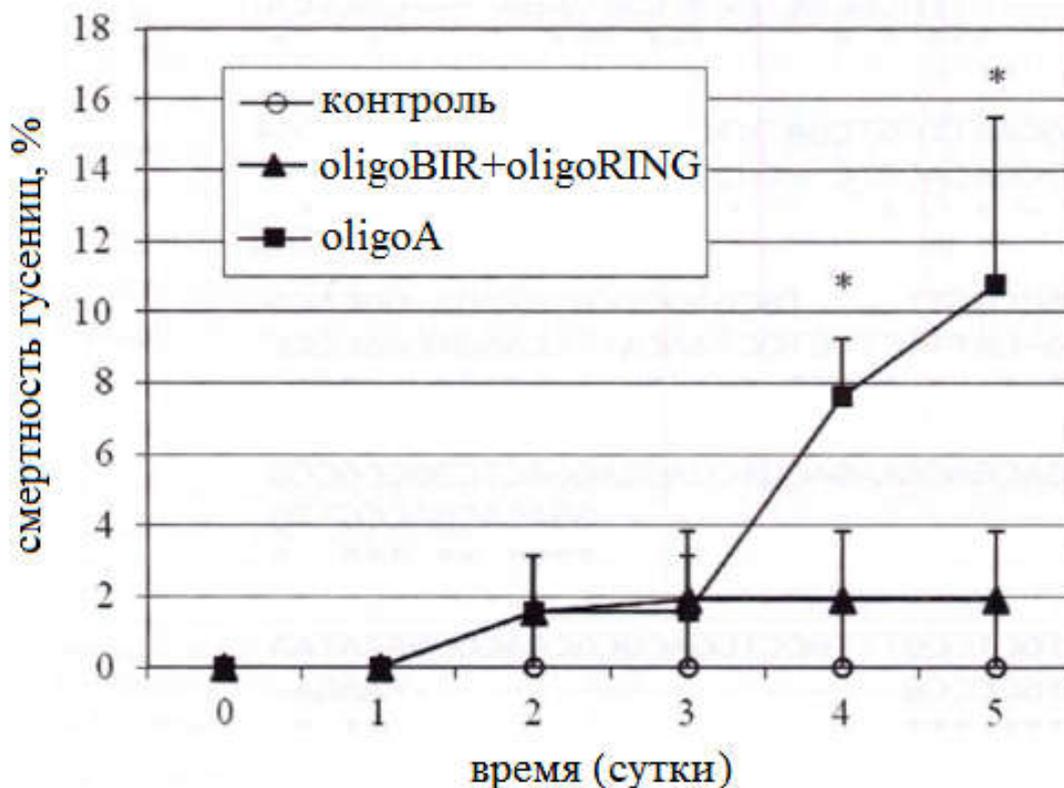


Рисунок 3.3 – Динамика смертности гусениц непарного шелкопряда после их контактной обработки ДНК-олигонуклеотидами и водой (контроль): oligoRING-фрагментом (ДНК-инсектицид; антисмысловый фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ; 5'-CGA CGT GGT GGC ACG GCG-3'), oligoBIR-фрагментом (контрольный фрагмент; смысловый фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ; 5'-GCC GGC GGA ACT GGC CCA-3'), oligoA-фрагментом (контрольный фрагмент; 5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA-3'). 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 р39 ВЯП НШ (Рисунок 3.4). Эксперимент был проведён в 4-х повторностях по 20-30 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

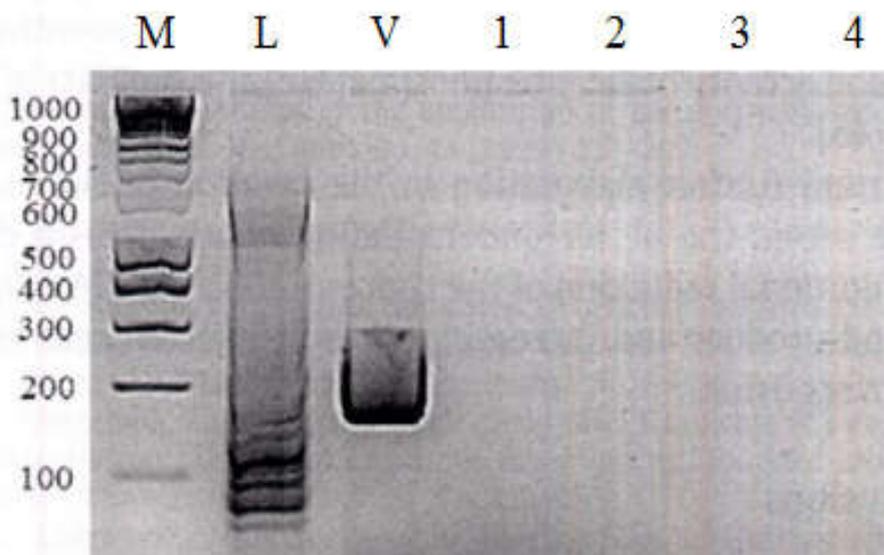


Рисунок 3.4 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК непарного шелкопряда, полученных с использованием праймеров к гену полиэдрин ВЯП НШ (подраздел 2.7) для детекции вируса в тканях насекомого: К – контроль; М – маркер молекулярных весов ДНК (100-1000 п.н. с шагом в 100 п.н.); 1-4 – индивидуальные электрофоретические спектры особей; L – ДНК-спектр вируса ядерного полиэдроза шелкопряда-монашенки, полученный при помощи oligoBIR-фрагмента и oligoRING-фрагмента в качестве праймеров; V – (положительный контроль) с маркером вирусной ДНК длиной 181 п.н., ДНК вируса выделена из препарата "Вирин НШ" (Россия)

В среднем, перед началом эксперимента, на деревьях было обнаружено по  $33,9 \pm 4,2$  гусениц II-III личиночных возрастов. Деревья вместе с находящимися на них гусеницами непарного шелкопряда были контактно обработаны ДНК-олигонуклеотидами в концентрации 5 пмоль/мкл из расчёта 0,25 литра на дерево, т.е. на каждое дерево было израсходовано 1,2 мкмоль олигонуклеотида. Через 2 недели на модельных деревьях были собраны все гусеницы насекомого и оценена их средняя смертность. В контрольной группе, группе "oligoNB" и группе "oligoRING" выживаемость гусениц составила  $14,8 \pm 2,6$ ,  $11,9 \pm 3,1$  и  $3,7 \pm 1,3$  особей соответственно (Рисунок 3.5). Естественное уменьшение количества особей насекомого в контрольной группе за 2 недели связано с тем, что некоторые

особи погибают в естественных условиях среды от хищников, болезней и других факторов среды обитания. Нужно отметить, что не было обнаружено в течение 2-х недель наблюдений и через год после эксперимента каких-либо негативных изменений со стороны деревьев осины (цвет и форма листьев).

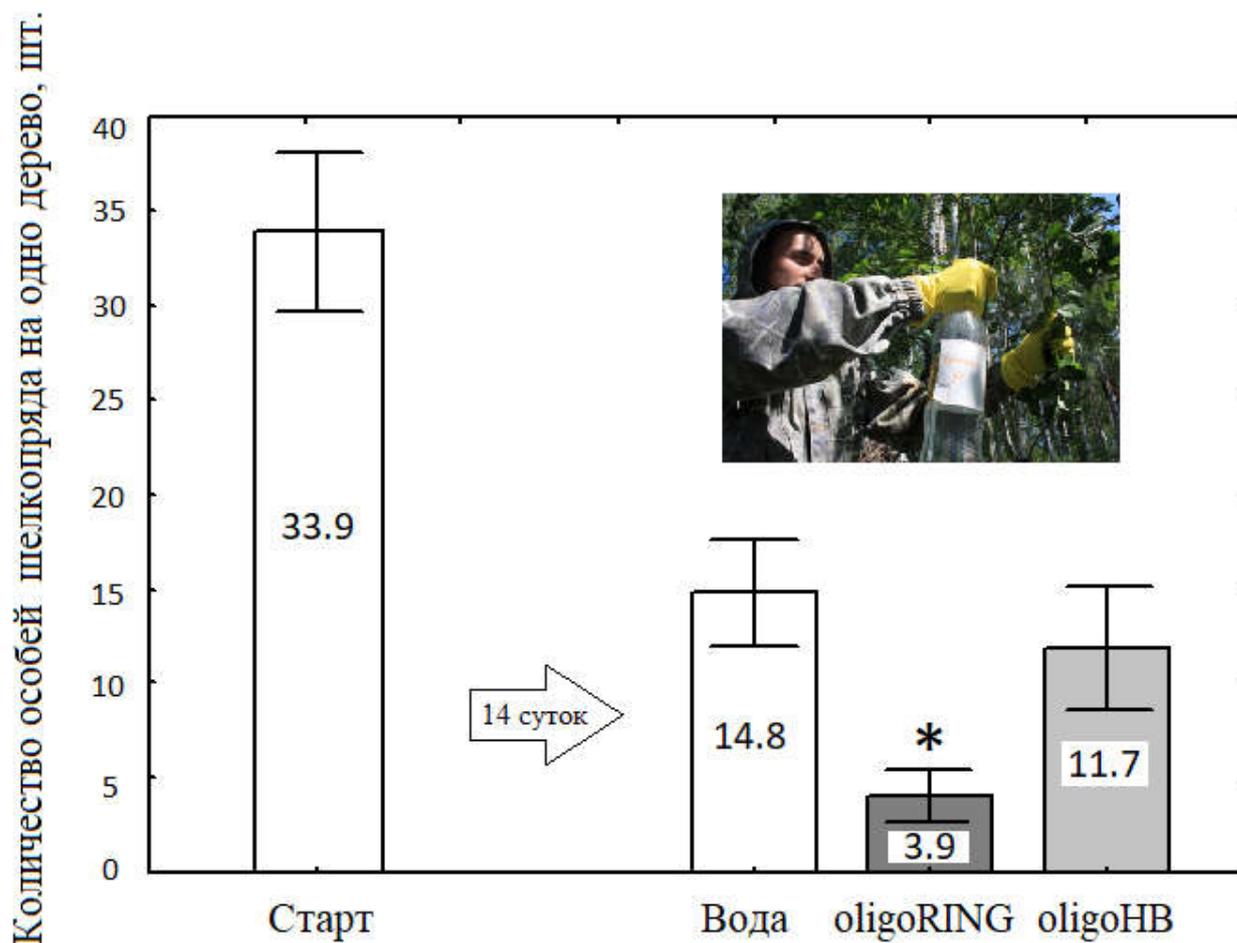


Рисунок 3.5 – Выживаемость особей непарного шелкопряда после контактного применения oligoRING-инсектицида, oligoHB-фрагмента и воды (контроль); на графике представлены средние и ошибки средних для 3-х повторностей; достоверность различий против контроля обозначено \* при  $p < 0,05$

Таким образом, данные показывают, что в полевом эксперименте ДНК-инсектициды также эффективны и снижают выживаемость гусениц непарного шелкопряда за 14 суток на 73,7% по сравнению с контрольной группой, обработанной водой. Применяемая концентрация ДНК-инсектицидов (1,2 мкмоль на дерево) эффективна и может быть доступной (синтез и очистка 1,2 микромолей

oligoRING- инсектицида сегодня обходится в 7-10 рублей). Нужно отметить, что смертность насекомого под действием oligoRING-инсектицида (73,7%) сравнима со смертностью непарного шелкопряда от димилина (в среднем 70-80%) – одного из популярных и неизбирательных химических агентов (блокирует синтез хитина у членистоногих).

Нужно отметить, что сходный достоверный инсектицидный эффект ( $p < 0,05$ ) был также обнаружен на гусеницах металлоvidки серой *Trichoplusia ni* Hübner с использованием смеси oligoBIR-фрагмента (5'-ACC CAT AGA GTT GGC AAT-3') и oligoRING-фрагмента (5'-CGA CAT GAC CGC AAG GTA-3') IAP-3-гена её вируса ядерного полиэдроза (Willis et al., 2005). Личинок насекомого погружали на 5 минут в раствор с ДНК-фрагментами в концентрации 100 пмоль/мкл (по 50 пмоль каждого из олигонуклеотидов) (Таблица 3.1). Эксперимент был проведён в 4 повторностях по 15-20 личинок для одной повторности каждого варианта эксперимента. Напротив, доза в 10 пмоль/мкл ДНК-фрагментов в группе "oligoBIR+oligoRING" не привела к достоверному повышению смертности насекомого, что указывает на эффективность более высоких доз препарата. Гусеницы металлоvidки серой являются серьёзным вредителем капустных культур и контактные ДНК-инсектициды могут стать одним из инструментов контроля численности данного вредителя (Chow et al., 2005).

Таблица 3.1 – Смертность металлоvidки серой в разных группах эксперимента на 7-е сутки после контактной обработки ДНК-олигонуклеотидами в концентрациях 100 пмоль/мкл и 10 пмоль/мкл

	Контроль	oligoA	oligoBIR+oligoRING
100 пмоль/мкл	76,7±6,7	73,3±13,3	43,3±8,8*
10 пмоль/мкл	76,7±3,3	80±10	83,3±6,7

Примечание: достоверность различий смертности насекомого в группе "oligoBIR+oligoRING" против контроля обозначена \* при  $p < 0,05$

Кроме этого, при использовании 2 мкл на 1 мл среды биоприлипателя "Липосам" (Органик Лайн, Россия) 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 (или 2 фемтомоль/мкл), где выращивались личинки. Эксперимент был проведён в 4 повторностях по 10-15 личинок для одной повторности каждого варианта эксперимента. Антисмысловой фрагмент антиапоптозного IAP-1-гена комара обыкновенного проявил достоверное инсектицидное действие и снизил выход имаго комара. Разница в частоте выхода имаго была обнаружена между контрольной группой (вода) и IAP-1-фрагмент + "Липосам" (29,1%;  $p < 0,001$ ), а также контрольной группой (вода) + "Липосам" и IAP-1-фрагмент + "Липосам" (21,9%;  $p < 0,01$ ) (Таблица 3.2 и Таблица 3.3).

Таблица 3.2 – Процент выхода личинок комара обыкновенного на стадию имаго в разных группах эксперимента

Группа	Выход на стадию имаго (%)
Контроль (вода)	82,3±7,8
Контроль (вода) + "Липосам"	75,1±11,3
IAP-1 + "Липосам"	53,2±10,1
HEX + "Липосам"	76,6±7,8

Таблица 3.3 – Значения  $\chi^2$ -критерия Пирсона между группами эксперимента

Группы	$\chi^2$	Значение p
Контроль (вода) + "Липосам" и IAP-1 + "Липосам"	7,65	p < 0,01
Контроль (вода) Контроль + "Липосам"	2,04	p > 0,05
Контроль (вода) + "Липосам" и HEX + "Липосам"	0,03	p > 0,05
Контроль (вода) и IAP-1 + "Липосам"	17,1	p < 0,001

Последовательность применённого антисмыслового фрагмента антиапоптозного IAP-1-гена была следующей: 5'-CAC AAC GTG GCC ACA CGG-3' (группа "IAP-1"). В качестве контрольного антисмыслового олигонуклеотида использовался ДНК-фрагмент гена гексокиназы комара обыкновенного с последовательностью 5'-TTG ACG ATG GCC AGG CGA-3' (группа "HEX").

Ввиду наличия большого количества видов-двойников среди кулицид, для идентификации личинок комара обыкновенного была проведена ПЦР со специфическими праймерами к гену аллатостатина (Рисунок 3.6). Было показано, что собранные в природе по морфологическим признакам насекомые действительно являются личинками комара обыкновенного.

Контроль численности комара обыкновенного является актуальной задачей. Самки комара обыкновенного (комара-пискуна) являются переносчиками различных заболеваний человека, например, японского энцефалита, менингита, а также болезней животных, например, птичьей малярии. Одними из наиболее часто используемых сегодня химическими агентами для регуляции численности комара обыкновенного являются инсектициды из класса пиретроидов (Ткачёв, 2004). Помимо личинок комаров, пиретроиды оказывают негативное влияние, например, на рыб, птиц, млекопитающих, нецелевых насекомых. Таким образом, обрабатывая личинок комаров пиретроидами, оказывается негативное влияние и на другие организмы. Период полураспада пиретроидов сравнительно

длительный и в большинстве случаев составляет от нескольких суток до 20 месяцев (в зависимости от типа пиретроида и условий среды), что продлевает отравляющий эффект данного класса инсектицидов, (Laskowski et al., 2002), в том числе для нецелевых организмов. Результаты исследований (Таблица 3.2 и Таблица 3.3) показали инсектицидный эффект IAP-1-фрагмента, в результате которого снижается количество особей, переходящих на стадию имаго. Использование природного полимера в качестве инсектицида должно привести к снижению токсической нагрузки на окружающую среду. На сегодняшний день препараты для контроля численности насекомых, в том числе кровососущих, на основе коротких антисмысловых олигонуклеотидов не используются.

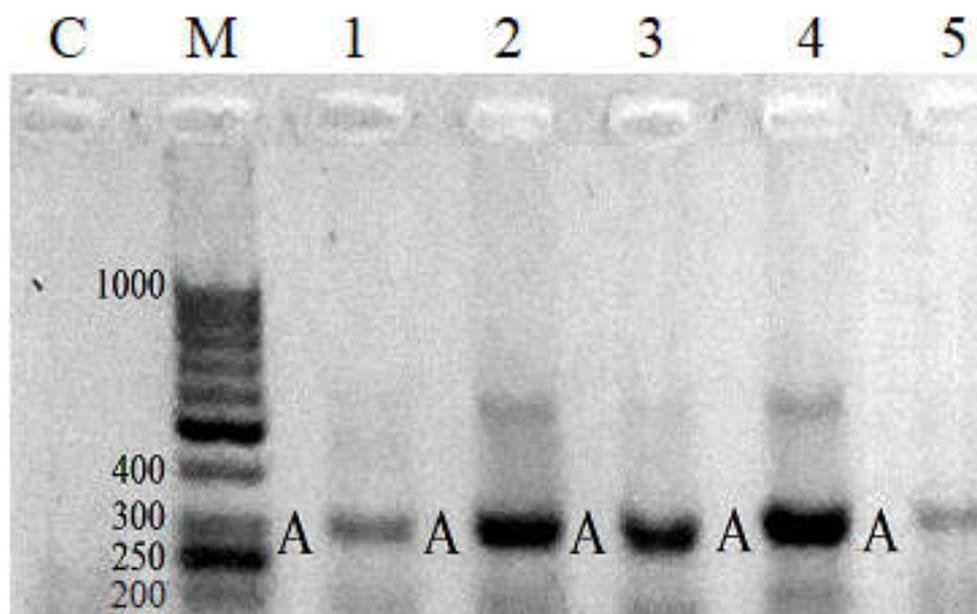


Рисунок 3.6 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК комара обыкновенного со специфическими праймерами, иницирующими клонирование фрагмента гена аллатостатина: С – контроль; М – маркер молекулярных весов ДНК (200-1000 п.н.); 1-5 – электрофоретические спектры комара обыкновенного; А – фрагмент гена аллатостатина длиной 303 п.н. Для детекции ДНК комара обыкновенного были использованы следующие праймеры: 5'-CGT CGA CGT CCT TAT CGA CGA С-3' (прямой); 5'- TCA TCT CCG GTG CAC GGT ACA G -3' (обратный)

Таким образом, было продемонстрировано, что антисмысловые фрагменты антиапоптозных генов обладают инсектицидным эффектом на насекомых-вредителях, что открывает перспективу применения ДНК-инсектицидов в лесах (непарный шелкопряд), агроценозах (металловидка серая) и пресных водоёмах (комар обыкновенный). Также в данной части диссертации была показана универсальность подхода и возможность создания по общей схеме ДНК-инсектицида против любого насекомого, которое не ведёт скрытый образ жизни на личиночной стадии развития. Таким свойством не обладало пока ещё ни одно поколение инсектицидов. Дальнейшие исследования должны увеличить инсектицидный эффект антисмысловых олигонуклеотидов до 85-90%, чтобы сделать смертность ДНК-инсектицидов сравнимой со смертностью большинства современных химических агентов и сделать их более конкурентноспособными.

### 3.2 Снижение биомассы насекомого

Также было обнаружено достоверное снижение в накоплении биомассы шелкопрядом под действием oligoRING-фрагмента на 7-е и 14-е сутки ( $p < 0,05$ ), что указывает на возможный запуск апоптотических процессов в клетках (Hamshou et al., 2013) (Рисунок 3.7). 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

На сегодняшний день это первые данные о влиянии короткого антисмыслового фрагмента антиапоптозного гена на снижение биомассы насекомого. Следует отметить, что снижение биомассы в данном эксперименте было достигнуто при использовании 3 нг ДНК/гусеницу. В экспериментах с использованием механизма РНК-интерференции для достижения различных биологических эффектов используются более высокие "стандартные" концентрации РНК с суммарной массой от 1 до 100 мкг на насекомое и пока ни в одном из них не сообщалось о снижении биомассы целевого насекомого.

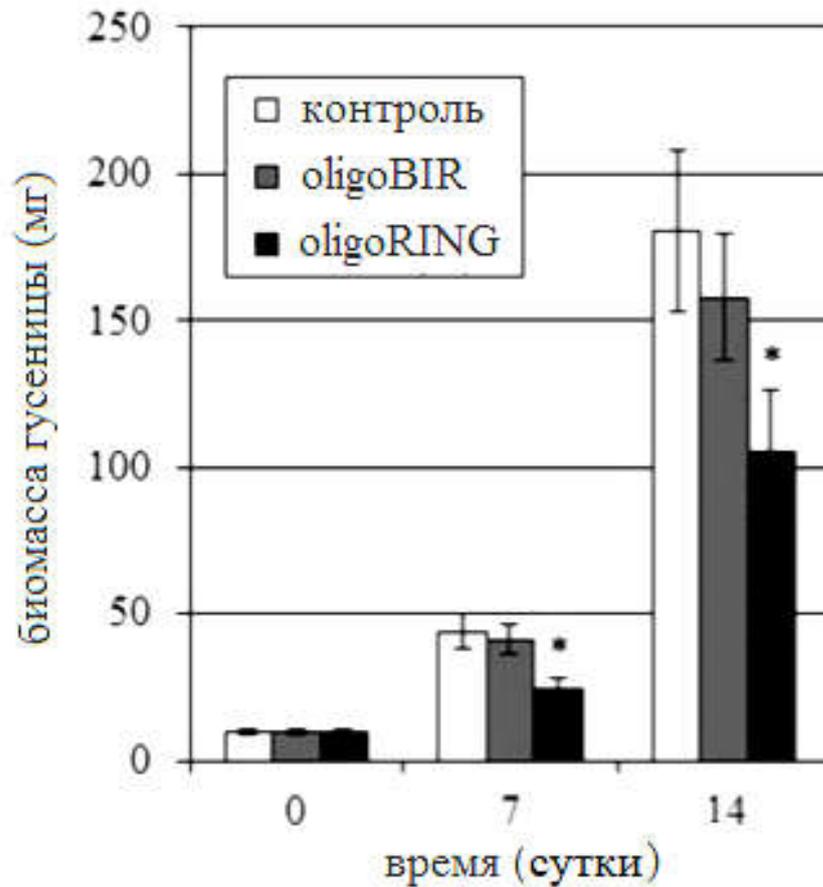


Рисунок 3.7 – Динамика накопления биомассы гусеницами непарного шелкопряда после их контактной обработки ДНК-олигонуклеотидами (oligoRING-фрагментом и oligoBIR-фрагментом) и водой. Достоверность снижения накопления биомассы насекомым в группе "oligoRING" против контроля обозначена \* при  $p < 0,05$

Дополнительно был проведён эксперимент по оценке снижения биомассы гусениц шелкопряда после обработки ДНК-олигонуклеотидами в природных условиях в лесу близ г. Ялты (с. Лавровое). Для данного эксперимента было отобрано 12 молодых деревьев дуба пушистого (подроста) высотой 70-80 см (Рисунок 3.8). Было использовано по 3 дерева на каждую группу эксперимента: контрольную группу, группы "oligoBIR", "oligoRING" и "oligoCpG" (контрольный фрагмент; неспецифический индуктор толл-подобного мембранного рецептора 9 (TLR9); 5'-CGC GCG CGC GCG CGC GCG-3'). На каждое дерево было посажено по 70 гусениц непарного шелкопряда 1-го возраста со средней массой  $5,41 \pm 0,19$

мг, которые были выращены в лаборатории. Через сутки деревья вместе с находящимися на них гусеницами непарного шелкопряда были обработаны ДНК-олигонуклеотидами в концентрации 5 пмоль/мкл из расчёта 24 мл на дерево. Через 2 недели на модельных деревьях были собраны гусеницы (по 8-10 штук с каждого дерева) и оценена их средняя биомасса. В контрольной группе, группе "oligoBIR", группе "oligoCpG" и группе "oligoRING" биомасса гусениц составила  $45,7 \pm 5,5$  мг,  $38,3 \pm 5,7$  мг,  $38,6 \pm 6,6$  мг и  $29,9 \pm 4$  мг соответственно (Рисунок 3.9). Наибольшее и достоверное снижение биомассы гусениц по сравнению с контролем было достигнуто в группе "oligoRING" (в среднем на 34,6%), что коррелирует со снижением за 2 недели биомассы гусениц, взятых в природе и обработанных в лабораторных условиях – 41,4% (Рисунок 3.7). Таким образом, в природных условиях было достигнуто достоверное снижение биомассы гусениц в группе "oligoRING" по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Нужно отметить, что пульверизация деревьев при помощи ранцевого опрыскивателя или генератора холодного тумана не составляет большого труда и может быть использована на достаточно обширных площадях очагов размножения вредителя без участия средств авиации. Кроме этого, нами не было обнаружено в течение 2-х недель наблюдений каких-либо негативных изменений со стороны деревьев дуба пушистого (цвет и форма листьев). На следующий год после эксперимента визуально различимых изменений в цвете и форме листьев, а также росте деревьев опытной группы по сравнению с контролем также не было обнаружено.



Рисунок 3.8 – Примеры модельных деревьев дуба пушистого в с. Лавровое, которые были отобраны для эксперимента: С<sub>1</sub> (контрольная группа), В<sub>1</sub> (группа "oligoBIR") и R<sub>1</sub> (группа "oligoRING")

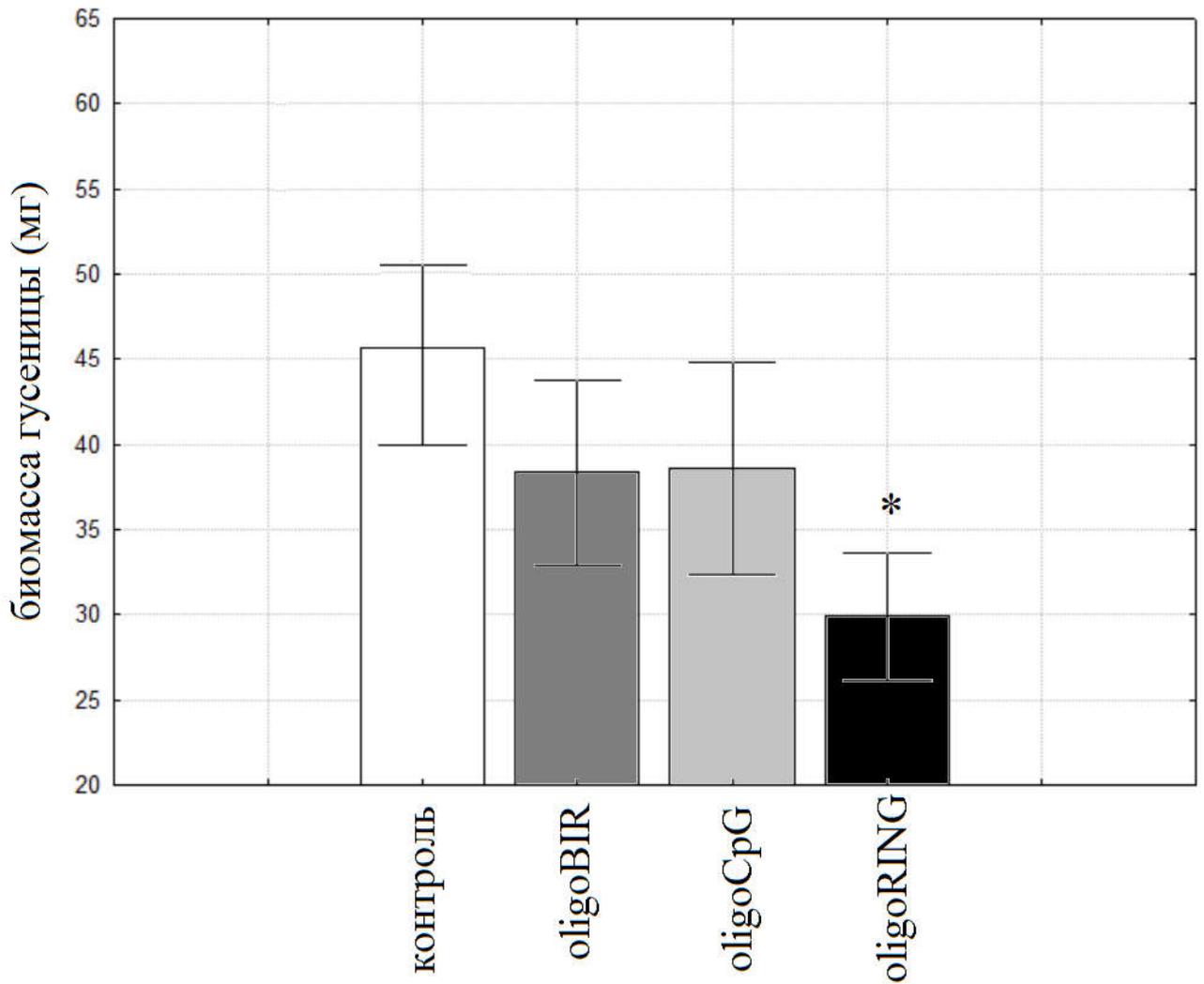


Рисунок 3.9 – Средняя биомасса гусениц непарного шелкопряда через 14 суток после их контактной обработки ДНК-олигонуклеотидами и водой. Для определения биомассы в среднем было использовано по 8-10 гусениц с 3-х деревьев для каждой группы эксперимента. Достоверность снижения накопления биомассы насекомым 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, сформировавшихся из обработанных гусениц (Рисунок 3.7), 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 3.10). В группе "oligoRING" она была достоверно ниже по сравнению с контролем ( $p<0,05$ ).

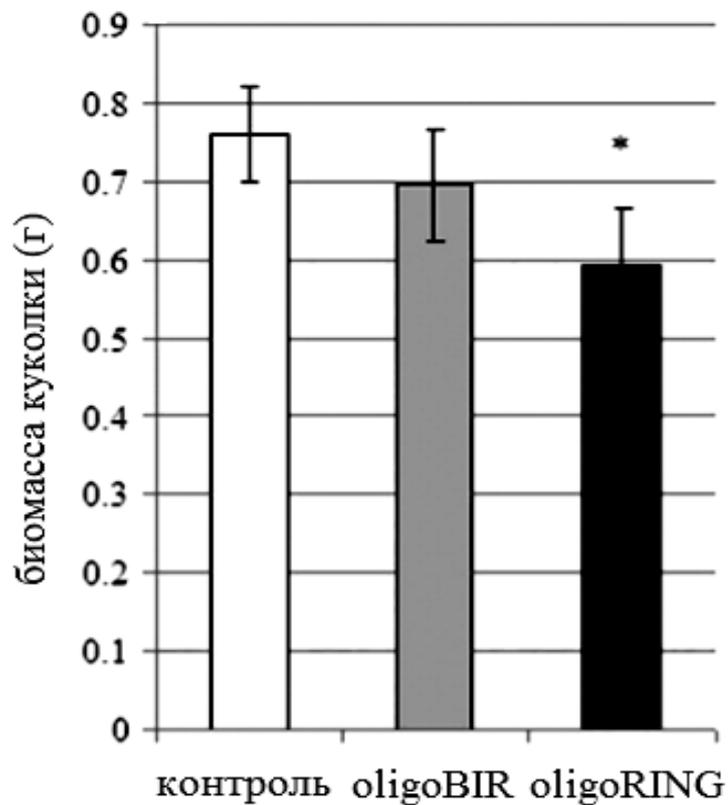


Рисунок 3.10 – Средняя масса куколок в разных группах эксперимента: контроль ( $n=28$ ), "oligoBIR" ( $n=23$ ), "oligoRING" ( $n=21$ ). Достоверность различия средней массы куколок в группе "oligoRING" против контроля обозначена \* при  $p<0,05$

Известно, что имаго непарного шелкопряда обладают половым диморфизмом и самки крупнее самцов, а куколки самок в среднем в 2,2 раза крупнее куколок самцов (Babaei 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, 0,43 – в группе "oligoBIR" и 0,38 – в группе "oligoRING" (группа "oligoRING" против контрольной группы –  $\chi^2=4,09$ ;  $df=1$ ;  $N=49$ ;  $p<0,05$ ) (Рисунок 3.11).

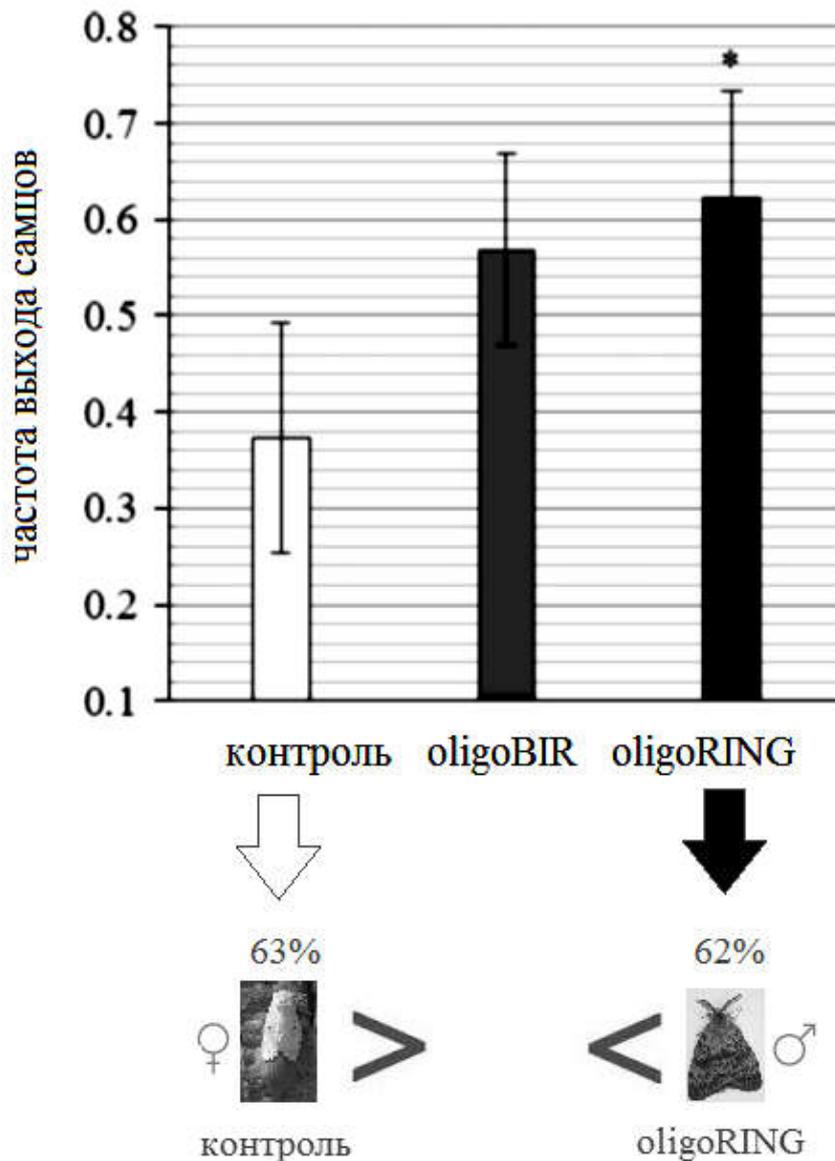


Рисунок 3.11 – Средняя частота вышедших из куколок самцов непарного шелкопряда в разных группах эксперимента. Достоверность различия средней массы куколок в группе "oligoRING" против контроля обозначена \* при  $p<0,05$

Таким образом, oligoRING-фрагмент не только обладает инсектицидным эффектом, но и приводит к тому, что в потомстве насекомого остаётся на 25%

меньше самок, чем в контроле, что снижает риски возникновения вспышки численности насекомого на следующий год в месте, где проведена обработка oligoRING-инсектицидом.

Было решено исследовать распространённость феномена снижения биомассы насекомого и уменьшения количества самок в потомстве среди насекомых и проведены опыты на личинках *D. melanogaster* дикого типа (г. Симферополь) с использованием антисмыслового oligoRING(-)-фрагмента (5'-ATT TAT TGG AGA ATG CAT AT-3') её антиапоптозного DIAP-2-гена в 9 повторностях. Было обнаружено, что после погружении личинок дрозофилы в раствор с концентрацией ДНК-олигонуклеотида 20 пмоль/мкл на 20 минут наблюдается снижение биомассы вышедших самок в группе "oligoRING" (Рисунок 1.12). Было также показано, что в группе "oligoRING" на 24% реже формировались самки дрозофилы, чем в контроле ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 1.13), что практически совпадает с данными, полученными на шелкопряде (Рисунок 3.11).

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*, хорошо изученного и ответственного за возникновение пола у дрозофилы (Salz, 2010).

На сегодняшний день не имеется каких-либо научных данных о роли антиапоптозных IAP-генов и IAP-белков в определении пола у дрозофилы. Геном дрозофилы кодирует два основных IAP-белка, DIAP-1 и DIAP-2. Белок DIAP-1 необходим непрерывно во многих клетках, чтобы ингибировать апикальную каспазу Dronc и эффекторные каспазы (Hay et al., 2004). Некоторые исследования показали, что DIAP-2-белок также может выполнять важную роль в ингибировании апоптоза (Vucic et al., 1997; Leulier et al., 2006). Следует отметить, что DIAP-2-белок имеет три домена BIR в своём составе, в то время как DIAP-1-

белок имеет только два домена BIR. Наличие нескольких доменов BIR повышает гибкость и эффективность ингибирования каспаз (Bergmann, 2010) и может определять другие разнообразные функции (Rumble, 2008). В данном эксперименте было показано, что контактное применение короткого антисмыслового oligoRING(-)-фрагмента DIAP-2-гена эффективно модулирует развитие дрозофилы, значительно уменьшая количество имаго самок и снижая их биомассу.

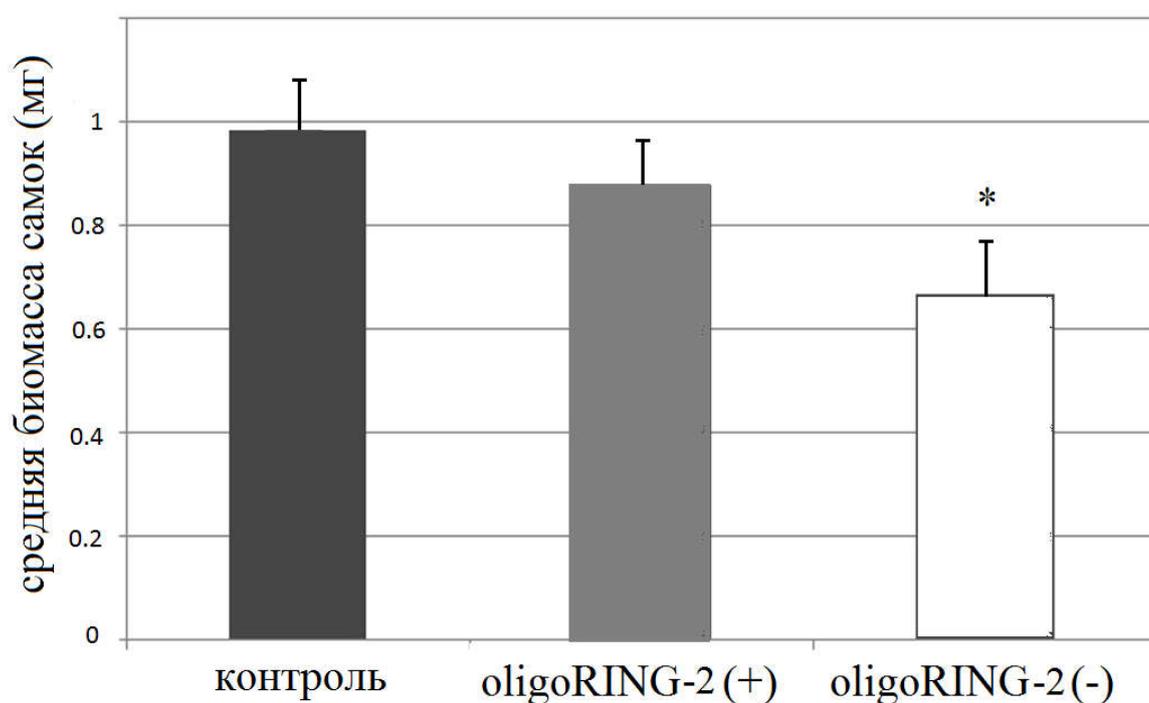


Рисунок 3.12 – Средняя биомасса вышедших из куколок самок дрозофилы в разных группах эксперимента: контрольная группа (вода); группа "oligoRING-2(+)" (смысловый фрагмент RING-домена DIAP-2-гена, 5'-ATA TGC ATT CTC CAA TAA AT-3'); группа "oligoRING-2(-)" (антисмысловый фрагмент RING-домена DIAP-2-гена, 5'-ATT TAT TGG AGA ATG CAT AT-3'). Достоверность различия средней массы куколок в группе "oligoRING(-)" против контроля обозначена \* при  $p < 0,05$

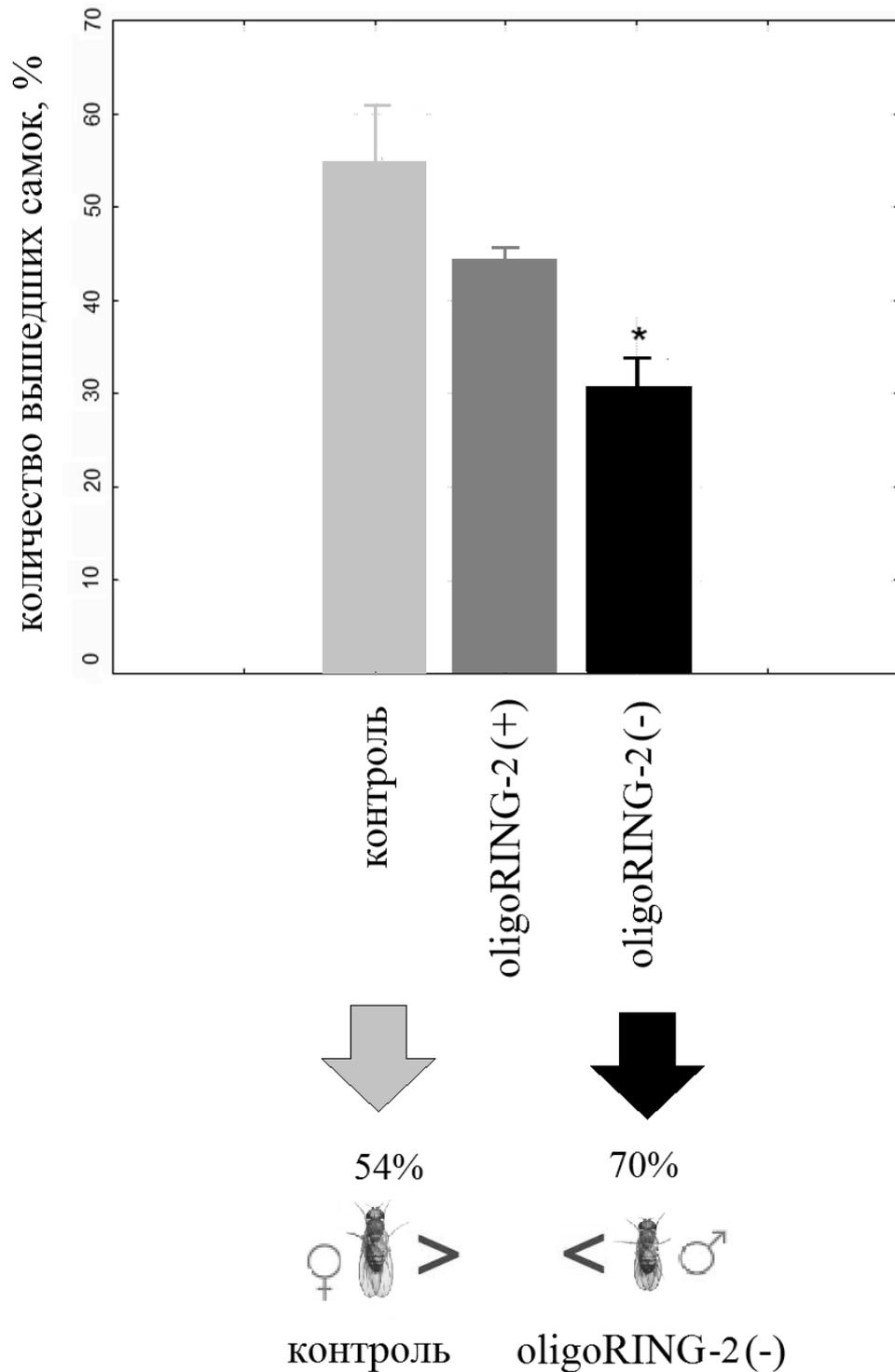


Рисунок 3.13 – Средняя частота вышедших из куколок самок дрозофилы в разных группах эксперимента: контрольная группа (вода), группа "oligoRING(+)", группа "oligoRING(-)". Достоверность снижения выхода самок из куколок в группе "oligoRING(-)" против контроля обозначена \* при  $p < 0,05$ . Эксперимент был проведён в 9-х повторностях по 20 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

Полученные результаты будут способствовать более глубокому пониманию биологии развития дрозофилы и могут найти практическое применение в борьбе с насекомыми-вредителями, например, непарным шелкопрядом, так как использование антисмысловых oligoRING-фрагментов антиапоптозных генов способно приводить к формированию меньшего количества самок в потомстве и, как итог, популяция целевого насекомого-вредителя уменьшится на следующий год в месте обработки.

### **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 3.11) самки и самцы были скрещены в отдельных контейнерах. Отложенные самками яйца были проанализированы на содержание в них кальция и магния. Данные макроэлементы необходимы для активизации  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимых эндонуклеаз, участвующих в деградации ДНК в ходе апоптоза (Elmore, 2007). 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 контрольной группы 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 группе "oligoRING", группе "oligoBIR" и контрольной группе соответственно (Рисунок 3.14).

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. 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), которые сопровождают его до следующей генерации (яйца насекомого) включительно.

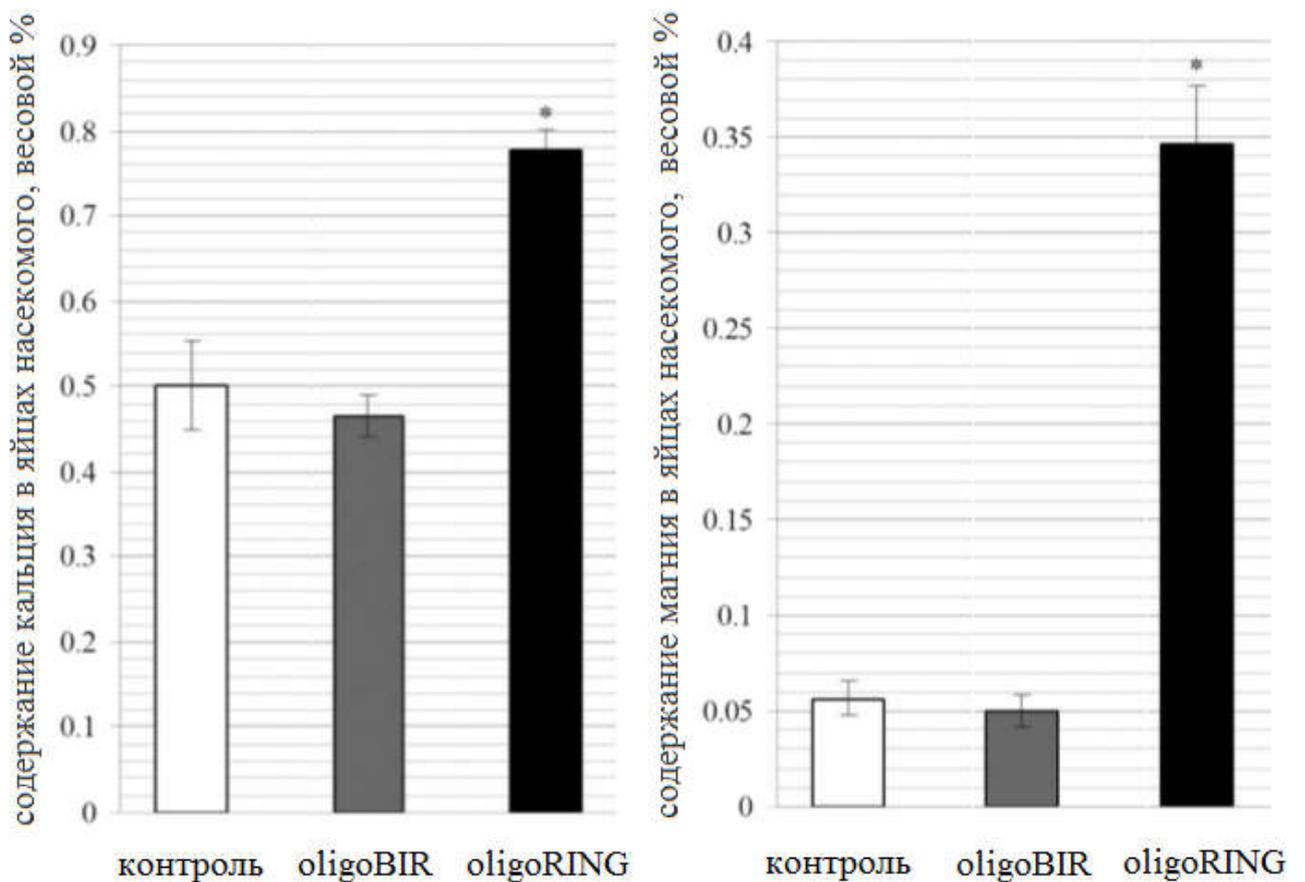


Рисунок 3.14 – Весовой процент содержания кальция и магния в яйцах самок непарного шелкопряда, выживших в ходе эксперимента. Достоверность различий содержания кальция и магния в группе "oligoRING" (n=3; по 100 яиц) против контроля обозначена \* при  $p < 0,05$ . Эксперимент проведён в 3-х повторностях, случайным образом были взяты 3 навески по 100 яиц из перемешанных яйцекладок самок каждой группы эксперимента

Нужно отметить, что яйца непарного шелкопряда из группы "oligoRING" обладали более высокой средней массой по сравнению с контролем ( $0,689 \pm 0,008$  мг против  $0,639 \pm 0,004$  мг) через 75 суток после того, как они были отложены самками. (Рисунок 3.15). Это указывает на замедление развития эмбрионов шелкопряда и медленным уменьшением дейтоплазмы яиц.

Применение препаратов для регуляции численности насекомых-вредителей имеет длительную историю. Накопленный опыт следует использовать для создания новых инсектицидов, в том числе препаратов на основе нуклеиновых кислот. Одна из важнейших проблем, затрудняющих совершенствование методов регуляции численности насекомых, – возникновение резистентности к инсектицидам, которое подталкивает исследователей к постоянному поиску новых препаратов (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 возникать медленнее. Это связано с тем, что мутации в консервативном участке гена возникают реже, поэтому и реже будет изменяться целевой участок мРНК, с которой комплементарно будет взаимодействовать ДНК-инсектицид и способствовать её разрушению по механизму действия антисмысловых олигонуклеотидов (Sharma et al., 2014). Достаточно заманчиво получить инсектицид с оперативным сроком действия порядка 100 лет и выше. Полученные данные позволяют по-новому подойти к контролю численности листогрызущих насекомых и использовать данный подход в антирезистентных программах.

Нужно отметить, что скорость действия oligoRING-инсектицида на непарном шелкопряде сравнима со скоростью действия биологических препаратов, в частности бакуловирусных, обладающих латентным периодом, который длится от 3-5 до 10-12 суток (Гулий, 1988). При этом синтез ДНК-олигонуклеотидов может быть автоматизирован и существенно удешевлён, тогда как биологические препараты не обладают таким потенциалом.

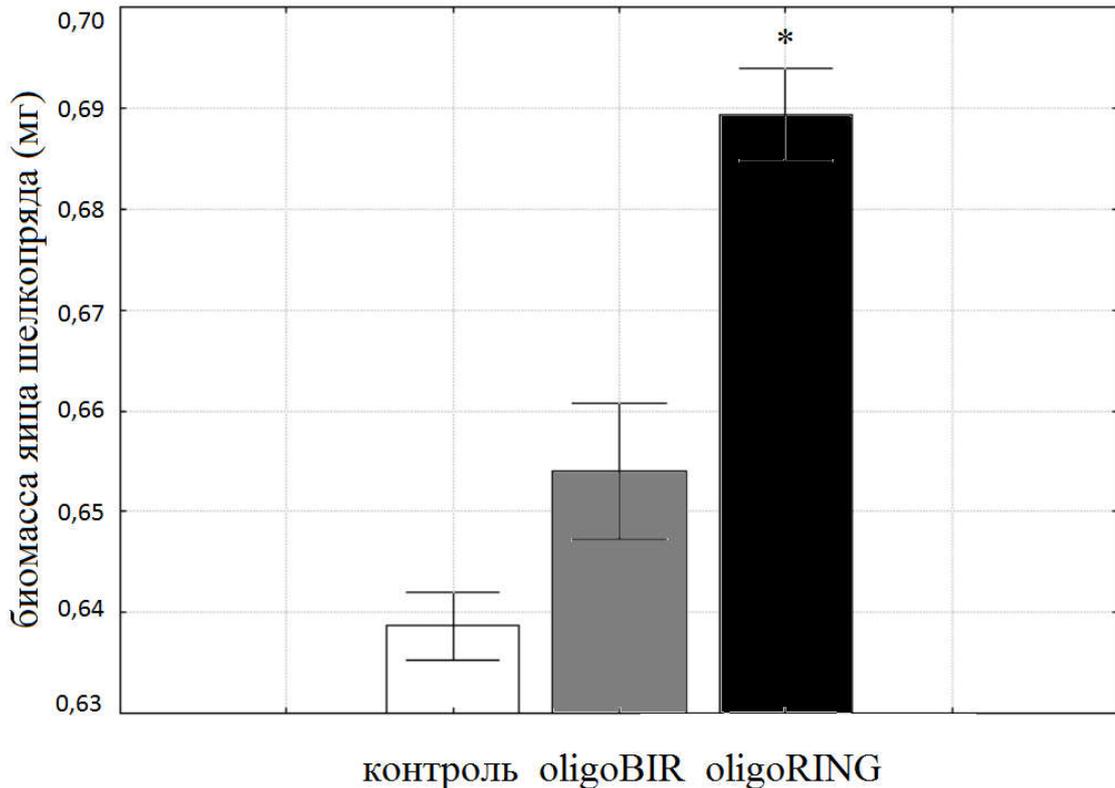


Рисунок 3.15 – Средняя масса яиц непарного шелкопряда из разных групп эксперимента. Достоверность различия средней массы яиц насекомого в группе "oligoRING" против контроля обозначена \* при  $p < 0,05$ . Эксперимент проведён в 3-х повторностях. Для эксперимента случайным образом были взяты 3 навески по 100 яиц из перемешанных яйцекладок каждой группы эксперимента. Размер (диаметр) яиц был одинаковым и составил в среднем  $1,23 \pm 0,035$  мм ( $n=30$ ),  $1,247 \pm 0,039$  мм ( $n=30$ ) и  $1,214 \pm 0,036$  мм ( $n=30$ ) в группе "oligoRING", "oligoBIR" и контроля соответственно

Дополнительно был проанализирован инсектицидный эффект 2-х коротких одноцепочечных фрагментов (смыслового и антисмыслового) хозяйского антиапоптозного IAP-1-гена. Обработку ДНК-олигонуклеотидами безвирусных гусениц непарного шелкопряда 1-го возраста провели контактным и пероральным путём. Для контактной обработки методом пульверизации нанесли 3 пмоль ДНК-фрагмента на 1 гусеницу. Для перорального введения гусениц непарного

шелкопряда поместили на питательную среду, содержащую 30 пмоль ДНК-олигонуклеотида на 1 мг среды, на которой насекомое выращивали в течение 2-х суток. Далее (ещё в течение 12 суток) выращивали на обычной питательной среде. На начало эксперимента биомасса гусениц составила  $0,96 \pm 0,05$  мг.

Кормление ДНК-фрагментами гусениц непарного шелкопряда не выявило достоверного инсектицидного эффекта ни для одного из ДНК-олигонуклеотидов. Это был достаточно ожидаемый результат, так как в кишечнике насекомых содержатся ДНК-нуклеазы, расщепляющие нуклеиновые кислоты до мономеров. И хотя в некоторых исследованиях с использованием механизма РНК-интерференции авторы обнаружили инсектицидный эффект на насекомых, которым доставили двухцепочечные фрагменты РНК в организм пероральным путём (Whyard et al., 2009; Li et al., 2011), ни в одном из этих исследований не было показано, что дцРНК-фрагменты не разрушаются в кишечнике насекомого. Можно предположить, что смертность в данных экспериментах наблюдалась из-за контакта покровов гусеницы с РНК-фрагментами.

Напротив, контактная обработка ДНК-олигонуклеотидами привела к достоверной смертности насекомого только в группе "oligoRING" по сравнению с контролем и на 14-е сутки эксперимента составила  $34,6\% \pm 5,4\%$  против  $16,5\% \pm 0,5\%$  соответственно ( $\chi^2=4,58$ ;  $df=1$ ;  $N=120$ ;  $p<0,05$ ) (Рисунок 3.16). Остальные ДНК-олигонуклеотиды не обнаружили достоверного инсектицидного действия на насекомое в ходе эксперимента. Результаты указывают на то, что антисмысловые фрагменты не всех антиапоптозных генов обладают существенным инсектицидным действием на целевое насекомое.

Данный раздел диссертационной работы раскрывает новые потенциальные пути контроля численности непарного шелкопряда и других насекомых-вредителей. В целом, влияние антисмысловых фрагментов ДНК антиапоптозных генов на клетки насекомых-вредителей является инновационной ветвью создания безопасных препаратов для регуляции численности листогрызущих насекомых. Идея ДНК-инсектицидов на основе антисмысловых фрагментов антиапоптозных генов является новой и в научной литературе отсутствуют данные об

аналогичных экспериментах. Некоторые западные учёные близки к этой идее, но они в основном сосредоточены на явлении РНК-интерференции и создании РНК-препаратов (Wang et al., 2011; Yu et al., 2013).

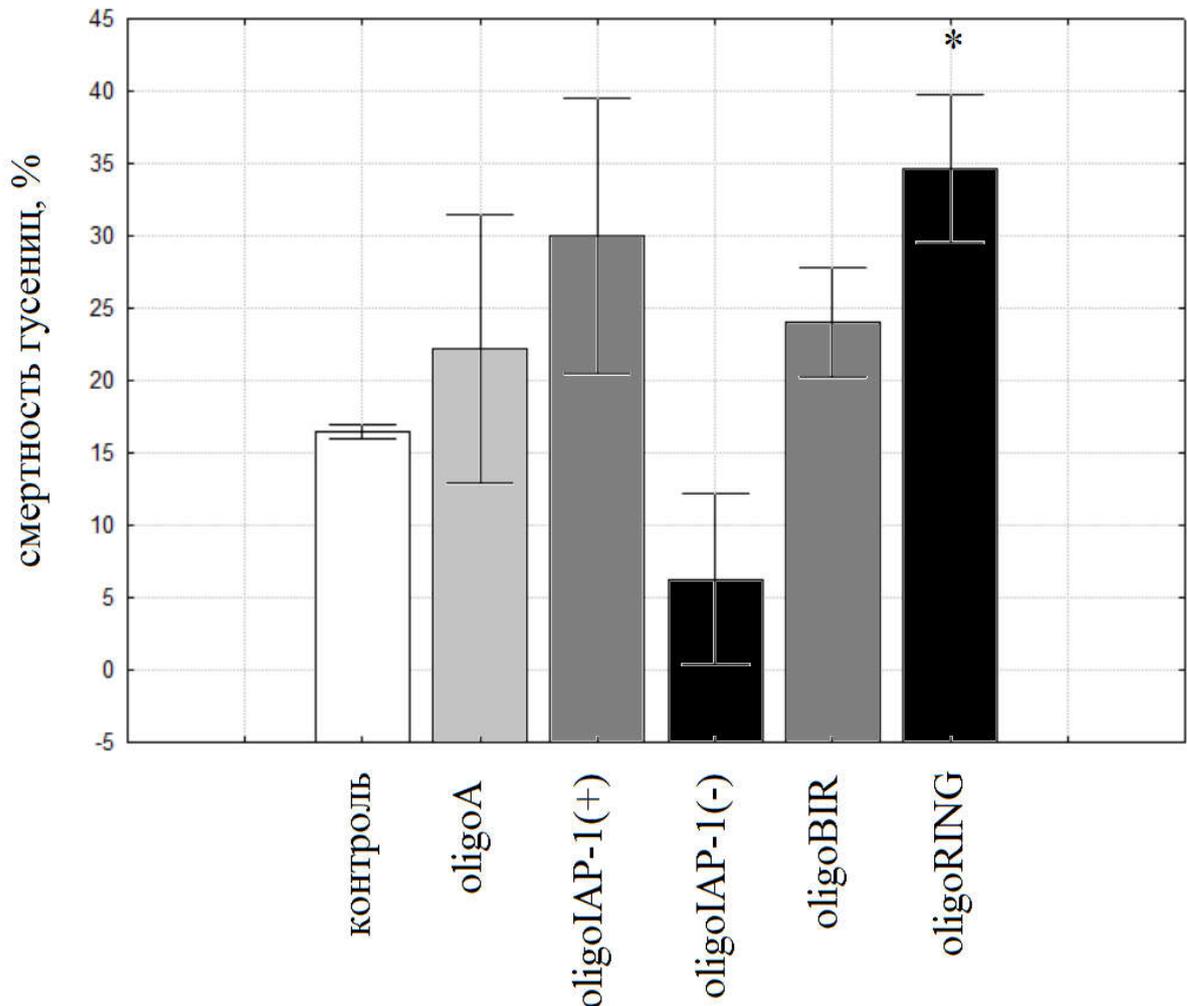


Рисунок 3.16 – Средняя смертность гусениц непарного шелкопряда через 14 суток после их контактной обработки водой и ДНК-олигонуклеотидами: oligoA-фрагментом (контрольный фрагмент; 5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA-3'), IAP-1(+)-фрагментом (смысловая цепь IAP-1-гена НШ; 5'-CGC TGC AAG TAA TGC TGA GG-3'), IAP-1(-)-фрагментом (антисмысловая цепь IAP-1-гена НШ; 5'-GCA CAC GCA ACT ACA TGT CC-3'), oligoBIR-фрагментом и oligoRING-фрагментом. 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 р39 ВЯП НШ (подраздел 2.7)

В частности, Belles (2010) предполагает, что РНК-интерференция сама по себе может быть использована в качестве инструмента для контроля насекомых-вредителей посредством выявления жизненно важных генов и снижения их экспрессии. Однако, отмечает Belles (2010), должны быть разработаны эффективные системы доставки двухцепочечной РНК в клетки насекомых. Wang et al. (2011) показали, что контактное распыление на гусеницах *Ostrinia furnacalis* Guenée водных растворов с дцРНК-фрагментами, направленными на инактивацию экспрессии целевых генов (например, гена хемотрипсина), приводило к гибели насекомого. Этот простой способ обработки насекомого продемонстрировал возможность проникновения дцРНК-фрагментов через покровы насекомых в клетки и запуска механизма РНК-интерференции. Ещё ранее, в 2008 г., Pridgeon et al. применили дцРНК-фрагменты, растворённые в ацетоне, для снижения экспрессии IAP-1-гена комара *Aedes aegypti* L. и вызвали достоверную гибель имаго самок насекомого. Wang et al. (2011) отмечают, что работа Pridgeon et al. (2008) на взрослых популяциях комаров является первым в мире исследованием, где были применены контактно двухцепочечные РНК-фрагменты в качестве инсектицидов. При подготовке рукописи диссертации было обнаружено, что свои результаты в статье Pridgeon et al. (2008) большинство авторов сочли во многом несостоятельными и интерпретированными неправильно (Pridgeon et al., 2016) в свете полученных ими новых результатов (Puglise et al., 2015). Puglise et al. (2015) сделали вывод, что IAP-гены могут не подходить в качестве мишеней для РНК-интерференции как метода контроля численности взрослых популяций комаров. Нужно отметить, что исследователи не ставят под сомнение контактный способ обработки насекомых с использованием ацетона, но считают, что уровень экспрессии целевого IAP-1-гена в имаго самок комара чаще всего недостаточен для того, чтобы вызвать смертность насекомого, используя механизм РНК-интерференции. При этом в работе Pridgeon et al. (2008) те же исследователи утверждали о наличии повышенной экспрессии IAP-1-гена в самках комара *A. aegypti*. Pridgeon et al. (2016) отмечают, что к неправильным результатам их привели некорректно выполненные расчёты экспрессии IAP-1-гена насекомого.

Однако при этом авторы не уточняют за счёт чего они смогли получить достоверную смертность насекомого, хотя бы даже в одной повторности эксперимента. Смертность в некоторых группах опыта была на 40-50% больше, чем в контроле. К сожалению, к данному моменту статью Pridgeon et al. (2008) процитировали уже почти 100 раз, ссылаясь на эту группу учёных как пионеров применения метода РНК-интерференции для регуляции численности насекомых.

Таким образом, применение ДНК-инсектицидов в 2008 г. (Оберемок, 2008а) оказалось самой первой и успешной исследовательской работой по применению нуклеиновых кислот в области популяционной экологии с целью создания контактных инсектицидов. Нужно отметить, что более целесообразным и перспективным является контактное применение коротких антисмысловых фрагментов ДНК функционально важных генов (в частности, антиапоптозных), чем применение относительно длинных двухцепочечных фрагментов РНК в связи с причинами, описанными в подразделе 1.7. Имея природное происхождение, ДНК-инсектициды обладают потенциалом стать одним из самых экологичных средств в борьбе с насекомыми-вредителями. Препараты на основе антисмысловых фрагментов ДНК (ДНК-инсектициды) могут объединить наилучшие качества современных инсектицидов и быть доступными, эффективными и безопасными одновременно.

## 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, 2008), которые либо сами противостоят клеточным апоптозным белкам, либо способны изменить активность клеточных генов, что приводит к сдвигу баланса сил в сторону антиапоптоза (Агол, 1997). Это даёт время размножиться вирусу в клетках насекомого, используя его ресурсы. Большое количество исследований направлено на то, чтобы вызвать гибель насекомого как можно быстрее.

#### **4.1 Повышение смертности гусениц, которых заразили ВЯП НШ в лабораторных условиях**

Одни из первых экспериментов по разработке ДНК-инсектицидов были проведены при совместном использовании фрагментов "oligoRING" и "oligoBIR" антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ. Было обнаружено, что эти фрагменты не всегда оказывают инсектицидный эффект на безвирусных насекомых, выращенных в лаборатории. Однако после заражения гусениц ВЯП НШ и

обработки фрагментами IAP-3-гена вируса всегда наблюдалось достоверное повышение смертности насекомого по сравнению с контролем (Рисунок 4.1).

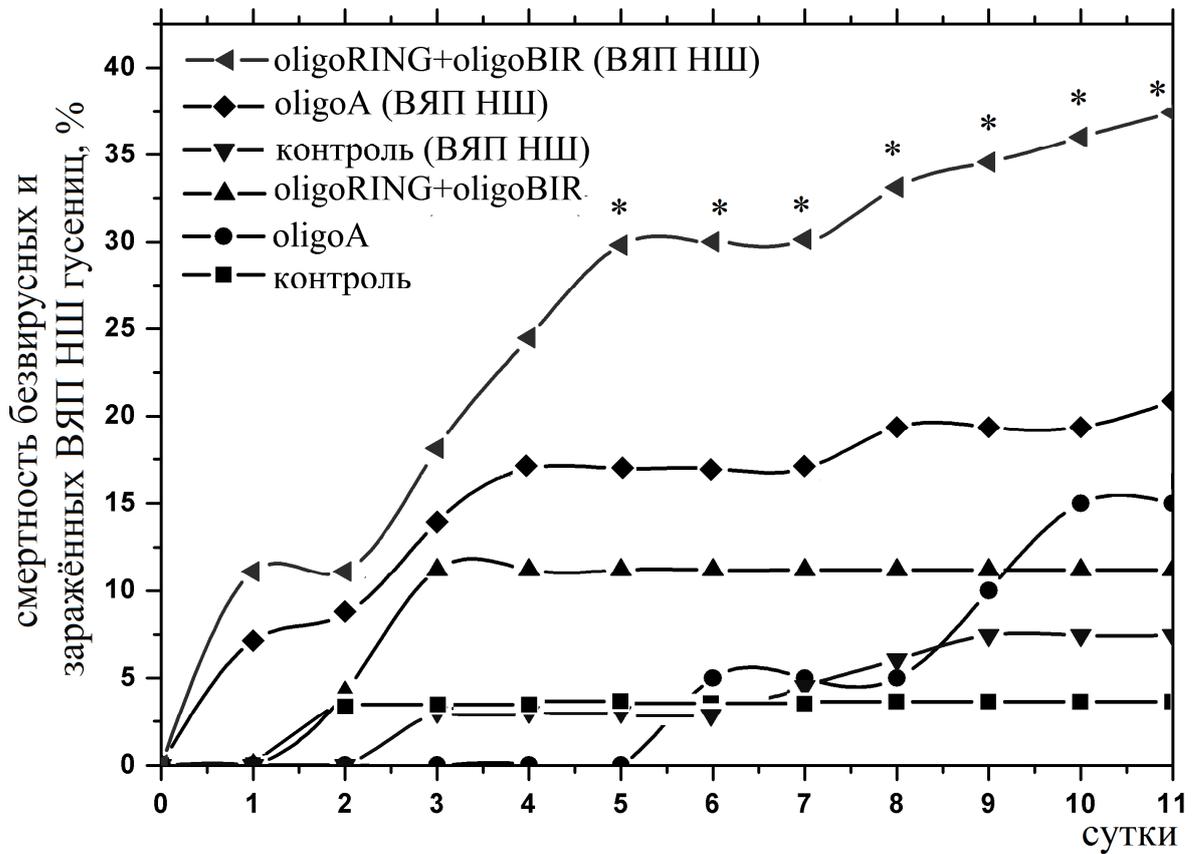


Рисунок 4.1 – Динамика смертности безвирусных и заражённых ВЯП НШ гусениц, которые были контактно обработаны водой и ДНК-олигонуклеотидами: oligoRING-фрагментом (ДНК-инсектицид; антисмысловый фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ; 5'-CGA CGT GGT GGC ACG GCG-3') и oligoBIR-фрагментом (контрольный фрагмент; смысловый фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ; 5'-GCC GGC GGA ACT GGC CCA-3'), а также oligoA-фрагментом (контрольный фрагмент; 5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA-3'). Изображена кумулятивная кривая со средней смертностью в сутки для 3-х повторностей. Достоверность смертности заражённого ВЯП НШ насекомого в группе "oligoRING" против заражённого контроля обозначена \* при  $p < 0,05$ . Эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 20-30 гусениц I-II возраста для одной повторности каждого варианта эксперимента

Перед обработкой ДНК-олигонуклеотидами гусениц кормили в течение 2-х суток на питательной среде, содержащей  $10^4$  вирусных полиэдров препарата "Вирин ЭНШ" (Кыргызстан) на 1 мг среды, а после заражения – на безвирусной среде. Зараженность гусениц ВЯП НШ составила 28,6% на 5-е сутки после окончания 2-дневного периода заражения (Рисунок 4.2). В эксперименте использовались гусеницы 3-х яйцекладок. Смертность в безвирусном контроле на 11-е сутки составила 3,6%.

Безвирусные насекомые во всех группах эксперимента показали смертность в пределах 3-15% в течение 11 суток эксперимента, которая была недостоверна по сравнению с контролем. Заражённые ВЯП НШ и обработанные фрагментами IAP-3-гена вируса (группа "oligoBIR-фрагмент+oligoRING-фрагмент") насекомые (30 пмоль/гусеницу) на 5-е сутки показали достоверную смертность по сравнению с контролем, 29,8% против 3,1% соответственно ( $\chi^2=12,01$ ;  $df=1$ ;  $N=127$ ;  $p<0,01$ ) (Таблица 4.1). К 11-му дню смертность возросла и составила 37,5%, 20,9 % и 7,5 % в группах "oligoBIR-фрагмент+oligoRING-фрагмент", "oligoA" и контроля соответственно. Только в группе "oligoBIR+oligoRING" смертность была достоверно выше по сравнению с контролем ( $\chi^2=13,01$ ;  $df=1$ ;  $N=127$ ;  $p<0,01$ ).

Хотя смертность зараженных гусениц в группе "oligoBIR+oligoRING" была достоверной, она не достигла высокого уровня. По-видимому, объяснение состоит в том, что не все исследованные гусеницы первого возраста смогли заразиться бакуловирусом в должной мере. Ebling et al. (2004) и Duan et al. (2011) сообщили, что  $LD_{50}$  для гусениц непарного шелкопряда второго возраста составляет приблизительно 100-700 вирусных полиэдров на гусеницу. В нашем эксперименте каждая гусеница получила дозу равную приблизительно 400-500 вирусных полиэдров, что было рассчитано по количеству несъеденного корма, оставшегося после 2-дневного периода заражения. Это привело к тому, что при помощи ПЦР была обнаружена ДНК ВЯП НШ только у 28,6% насекомых (Рисунок 4.2). Очевидно, что результат от применения ДНК-инсектицида на основе фрагментов IAP-3-гена ВЯП НШ, прежде всего антисмыслового oligoRING-фрагмента, зависит от динамики синтеза целевой мРНК. В случае заражённых ВЯП НШ

гусениц непарного шелкопряда, мРНК IAP-3-гена ВЯП НШ является мишенью (комплементарной последовательностью), которая взаимодействует с антисмысловым oligoRING-фрагментом. Это приводит к инициации посттранскрипционной инактивации экспрессии целевого антиапоптозного гена по механизму действия антисмысловых олигонуклеотидов (Dias, Stein, 2002; Sharma et al., 2014) и помогает заражённым клеткам претерпеть апоптоз, что в дальнейшем, при массовой гибели зараженных клеток, приводит к гибели целого насекомого. Таким образом, более высокий уровень заражения непарного шелкопряда ВЯП НШ должен обеспечить более высокий инсектицидный эффект от антисмыслового oligoRING-фрагмента. Справедливость данной гипотезы будет подробно проверена в 5-ом разделе диссертации путём анализа экспрессии целевых генов в ответ на применённые ДНК-олигонуклеотиды.

Таблица 4.1 – Статистический анализ инсектицидного эффекта от применения ДНК-олигонуклеотидов на безвирусных и заражённых ВЯП НШ гусеницах непарного шелкопряда на 5-е сутки после обработки

Экспериментальные группы		$\chi^2$ -значения	Число гусениц в паре сравниваемых групп
Безвирусные насекомые	oligoBIR+oligoRING и контроль	0,23	144
	oligoA и контроль	0,06	142
Заражённые насекомые	oligoBIR+oligoRING и контроль	12,01*	127
	oligoA и контроль	3,71	121

Примечание: достоверность смертности заражённых ВЯП НШ гусениц в группе "oligoBIR+oligoRING" против заражённого контроля обозначена \* при  $p < 0,01$

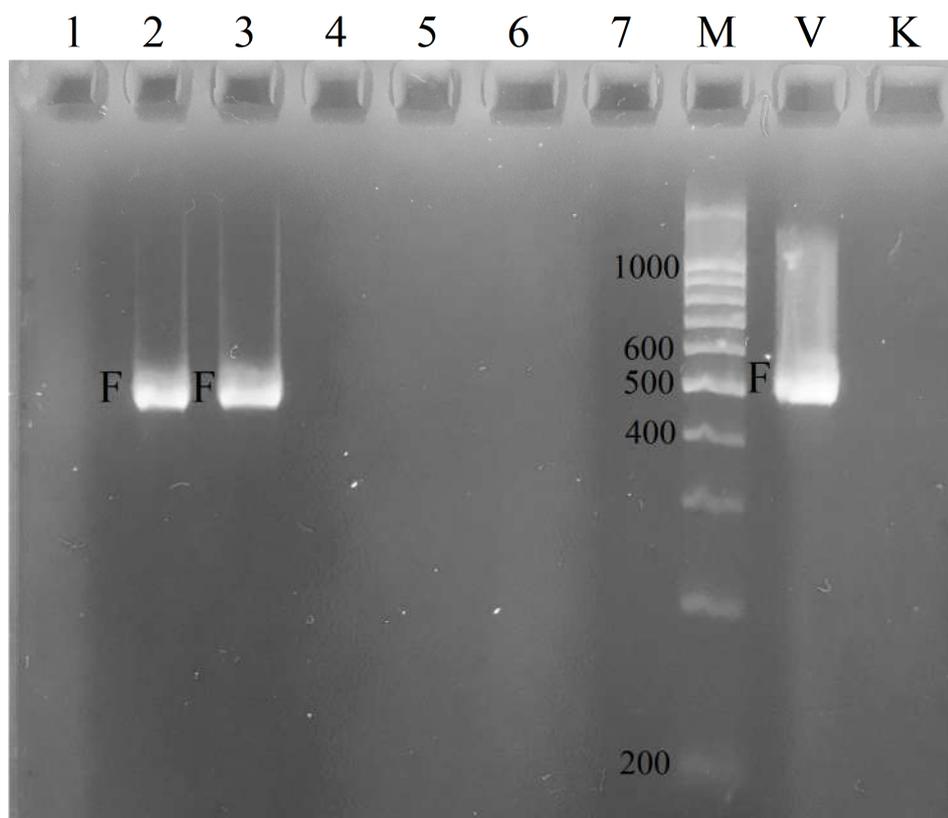


Рисунок 4.2 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК заражённого ВЯП НШ непарного шелкопряда, полученных с использованием праймеров для детекции ДНК ВЯП НШ (подраздел 2.7): К – отрицательный контроль; М – маркер молекулярных весов ДНК (с шагом в 100 п.н.); 1-7 – индивидуальные электрофоретические спектры особей; F – маркер вирусной ДНК длиной 524 п.н.; V – положительный контроль, ДНК вируса выделена из препарата "Вирин ЭНШ" (Кыргызстан)

При понижении концентрации ДНК-инсектицида до 3 пмоль/гусеницу также была обнаружена достоверность в смертности насекомых в группе "oligoRING" по сравнению с контрольной группой (вода) (Рисунок 4.3). Гусеницы непарного шелкопряда 1-го возраста были предварительно заражены ВЯП НШ в лаборатории и после этого обработаны oligoRING-фрагментом антиапоптозного IAP-3-гена вируса.

Гусениц заразили согласно методике, приведённой для эксперимента, результаты которого представлены выше (Рисунок 4.1). Для этого использовали

препарат "Пинквир" (Россия). Эффективность заражения гусениц ВЯП НШ была показана методом ПЦР со специфическими праймерами к гену капсида р39 ВЯП НШ (подраздел 2.7) и составила 50% на 5-е сутки после окончания 2-дневного периода заражения (Рисунок 4.4). Смертность в безвирусном контроле на 14-е сутки составила 7,9%. Были использованы гусеницы из одной яйцекладки.

На 7-е сутки после контактной обработки гусениц ДНК-олигонуклеотидами, достоверное увеличение смертности заражённых насекомых по сравнению с контрольной группой (вода) было обнаружено только в группе "oligoRING" ( $\chi^2 = 5,51$ ;  $p < 0,05$ ;  $df=1$ ;  $N=118$ ). Нужно отметить, что пик смертности заражённых ВЯП НШ гусениц в группе "oligoRING" наступил на 1-2 суток позже по сравнению с контролем, однако при этом была достигнута достоверно более высокая общая гибель насекомого. В среднем погибло 53,3%, 50,9%, и 74,1% особей из контрольной группы, группы "oligoCpG" и группы "oligoRING" соответственно. На 14-е сутки эксперимента число погибших насекомых повысилось и достигло 63,3%, 61,4% и 87,9% в контрольной группе, группе "oligoCpG" и группе "oligoRING" соответственно (группа "oligoRING" против контрольной группы –  $\chi^2 = 9,63$ ;  $df=1$ ;  $N=118$ ;  $p < 0,01$ ).

Таким образом, oligoRING-фрагмент на фоне бакуловирусной инфекции достоверно повысил смертность шелкопряда за отведённый промежуток времени в 14 суток. Полученные результаты указывают на перспективность совместного применения oligoRING-инсектицида и ВЯП НШ для защиты леса (применение ДНК-инсектицидов вслед за бакуловирусным препаратом).

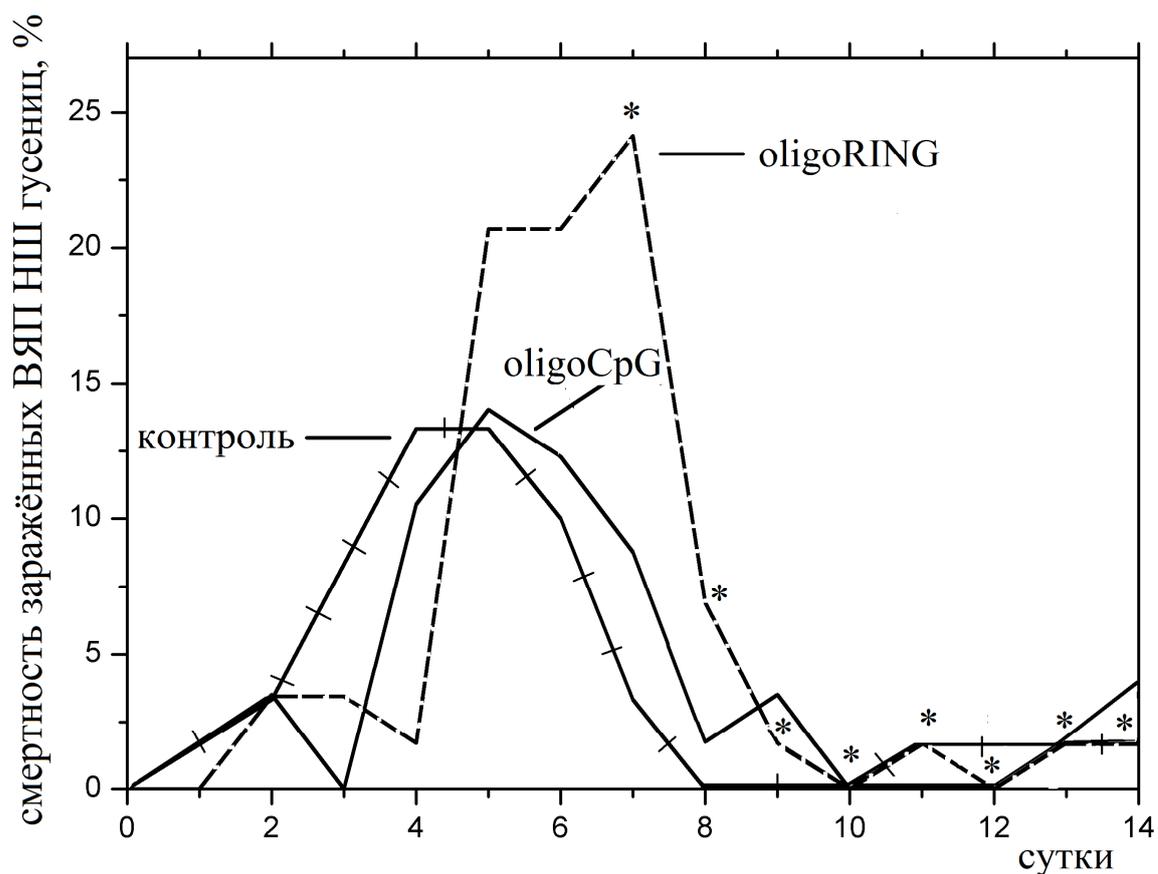


Рисунок 4.3 – Динамика смертности заражённых ВЯП НШ гусениц, которые были контактно обработаны водой и ДНК-олигонуклеотидами: oligoRING-фрагментом (ДНК-инсектицид; антисмысловый фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ; 5'-CGACGTGGTGGCACGGCG-3'), oligoCpG-фрагментом (контрольный фрагмент; неспецифический индуктор толл-подобного мембранного рецептора 9 (TLR9); 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  $p < 0,05$ . Эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 20-30 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

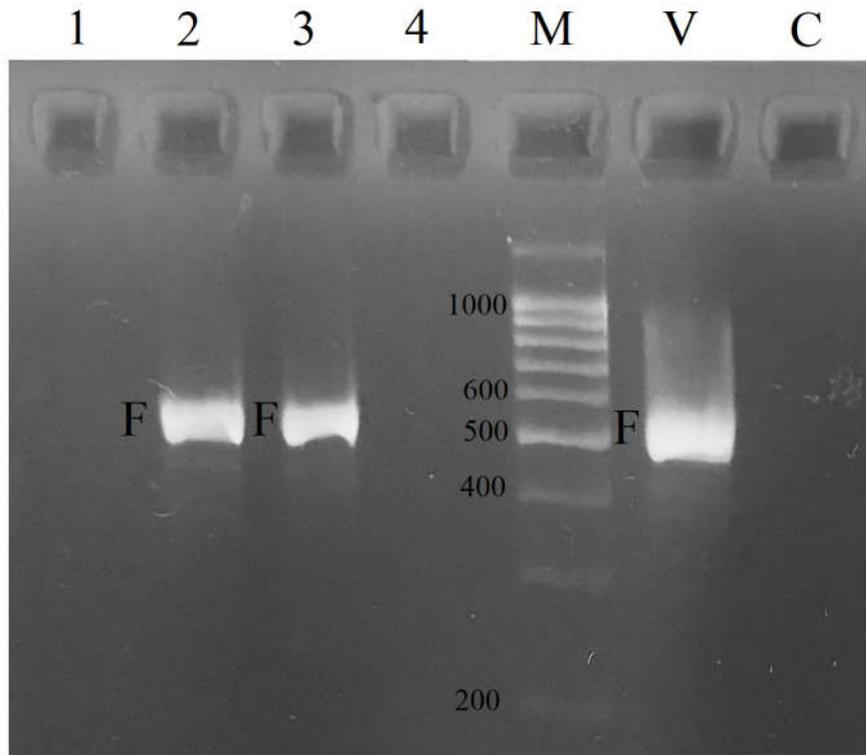


Рисунок 4.4 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК, заражённых ВЯП НШ гусениц непарного шелкопряда, полученные с использованием праймеров для детекции ДНК ВЯП НШ (подраздел 2.7): С – отрицательный контроль; М – маркер молекулярных весов ДНК (с шагом в 100 п.н.); 1-4 – индивидуальные электрофоретические спектры особей; F – маркер вирусной ДНК длиной 524 п.н.; V – положительный контроль, ДНК вируса выделена из препарата "Пинквир" (Россия)

Чтобы провести параллель с использованием РНК-препаратов на основе двухцепочечных РНК-фрагментов, было решено исследовать смертность заражённых ВЯП НШ гусениц и обработанных через 2 суток после заражения водой, oligoRING-фрагментом, а также двухцепочечным фрагментом ДНК – дц(oligoRING), состоящим из oligoRING-фрагмента и комплементарного ему смыслового фрагмента (5'-CGC CGT GCC ACC ACG TCG-3'). Было использовано 5 яйцекладок, которые были рандомизированы и вышедшие из яиц гусеницы были использованы для экспериментов. Смертность в безвирусном контроле на 7-

е сутки составила 14,8%. Перед обработкой ДНК-олигонуклеотидами (3 пмоль на гусеницу) насекомых содержали в течение 2-х суток на питательной среде, содержащей  $2 \times 10^3$  вирусных полиэдров препарата "Пинквир" (Россия) на 1 мг среды, а после заражения – на безвирусной среде. Зараженность гусениц ВЯП НШ была показана методом ПЦР со специфическими праймерами к гену капсида р39 ВЯП НШ (подраздел 2.7) и составила 40% на 5-е сутки после окончания 2-дневного периода заражения. Эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 20 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента.

На 7-е сутки после обработки достоверная смертность гусениц по сравнению с контролем была обнаружена только в группе "oligoRING" ( $\chi^2=4,78$ ;  $df=1$ ;  $N=120$ ;  $p<0,05$ ) (Таблица 4.2). Таким образом, дцДНК-фрагмент не оказался более эффективным в снижении выживаемости насекомого по сравнению с бессмысловым oligoRING-фрагментом, хотя и проявил заметную тенденцию.

Таблица 4.2 – Смертность зараженного ВЯП НШ гусениц шелкопряда на 7-е сутки эксперимента после контактной обработки ДНК-олигонуклеотидами

	Контроль	oligoRING	дц(oligoRING)
7-е сутки	68,3 ± 8,8%	86,7 ± 8,8%*	81,7 ± 6,1%

Примечание: достоверность смертности заражённых ВЯП НШ гусениц в группе oligoRING против заражённого контроля обозначена \* при  $p<0,05$

Было сделано предположение, что эффект повышения смертности заражённых ВЯП НШ насекомых при контактном применении oligoRING-инсектицида может проявиться и на близкородственном непарному шелкопряду виде из того же рода – шелкопряде-монашенке *L. monacha* L. Шелкопряд-монашенка является серьёзным вредителем-полифагом, кормовой базой для которого являются виды, принадлежащие к родам *Quercus*, *Salix*, *Carpinus*, *Tilia*, *Fagus*, *Picea* и *Pinus*. Распространён шелкопряд-монашенка в большинстве частей

Европы (Vanhanen et al., 2007). В отличие от непарного шелкопряда, является серьёзной угрозой для хвойных деревьев (Nakladal, 2015).

Перед обработкой ДНК-олигонуклеотидами гусениц кормили в течение 2-х суток на питательной среде, содержащей  $10^4$  вирусных полиэдров препарата "Вирина ЭНШ" (Кыргызстан), а после заражения – на безвирусной среде. В эксперименте использовались гусеницы 3-х яйцекладок. Смертность в безвирусном контроле на 11-е сутки составила 27,8%. Возможно, что питательная среда на основе проростков пшеницы (подраздел 2.2) не соответствуют нормальному рациону гусениц, которые отдадут предпочтение хвойным, вследствие чего была отмечена достаточно высокая смертность в контрольной группе. Однако в природных условиях гусеницы также могут испытывать влияние различных стресс-факторов, которые будут снижать их жизнеспособность. Таким образом, такой эксперимент, близок к реальным условиям и также ценен в практическом плане.

Безвирусные насекомые во всех группах эксперимента показали смертность в пределах 16,7-33,3% в течение 11 суток эксперимента, которая была недостоверна по сравнению с контрольной группой (вода). Заражённые ВЯП НШ и обработанные oligoBIR-фрагментом и oligoRING-фрагментом IAP-3-гена вируса, по 15 пмоль каждого из ДНК-олигонуклеотидов на 1 гусеницу, насекомые уже на 3-е сутки показали достоверную смертность по сравнению с контролем, 45,1% против 14,3% соответственно ( $\chi^2=7,39$ ;  $df=1$ ;  $N=89$ ;  $p<0,01$ ) (Таблица 4.3). К 11 дню смертность возросла и составила 85,5%, 78,3% и 62,6% в группе "oligoBIR+oligoRING", группе "oligoA" и контроле соответственно. Только в группе "oligoBIR+oligoRING" смертность оказалась достоверно выше по сравнению с контролем ( $\chi^2=5,64$ ;  $df=1$ ;  $N=89$ ;  $p<0,05$ ) (Рисунок 4.5).

Таким образом, к 11 дню эксперимента на фоне бакуловирусной инфекции в группе "oligoBIR+oligoRING" была обнаружена смертность на 58,2% больше, чем в безвирусном контроле ( $\chi^2=26,31$ ;  $df=1$ ;  $N=67$ ;  $p<0,01$ ), тогда как в заражённом контроле она была только на 34,8% больше, чем в контроле без вируса ( $\chi^2=13,36$ ;  $df=1$ ;  $N=68$ ;  $p<0,01$ ). Таким образом, можно использовать ВЯП НШ и его

антисмысловой фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена (oligoRING-фрагмент) для контроля численности близкородственного непарному шелкопряду вида – шелкопряда-монашенки. Нужно отметить, что этот новый подход к применению бакуловирусов и их антисмысловых фрагментов IAP-генов может составить конкуренцию разработкам по созданию препаратов на основе рекомбинантных вирусов, которые ещё пока не вышли на рынок.

Таблица 4.3 – Статистический анализ инсектицидного эффекта ДНК-олигонуклеотидов на безвирусных и заражённых ВЯП НШ гусениц шелкопряда-монашенки на 3-е сутки эксперимента

Экспериментальные группы		$\chi^2$ - значения	Число гусениц в паре сравниваемых групп
Безвирусные насекомые	oligoBIR+oligoRING и контроль	0,19	50
	oligoA и контроль	0,16	50
Заражённые насекомые	oligoBIR+oligoRING и контроль	7,39*	89
	oligoA и контроль	1,92	85

Примечание: достоверность смертности заражённых гусениц в группе "oligoBIR+oligoRING" против заражённого контроля обозначена \* при  $p < 0,01$

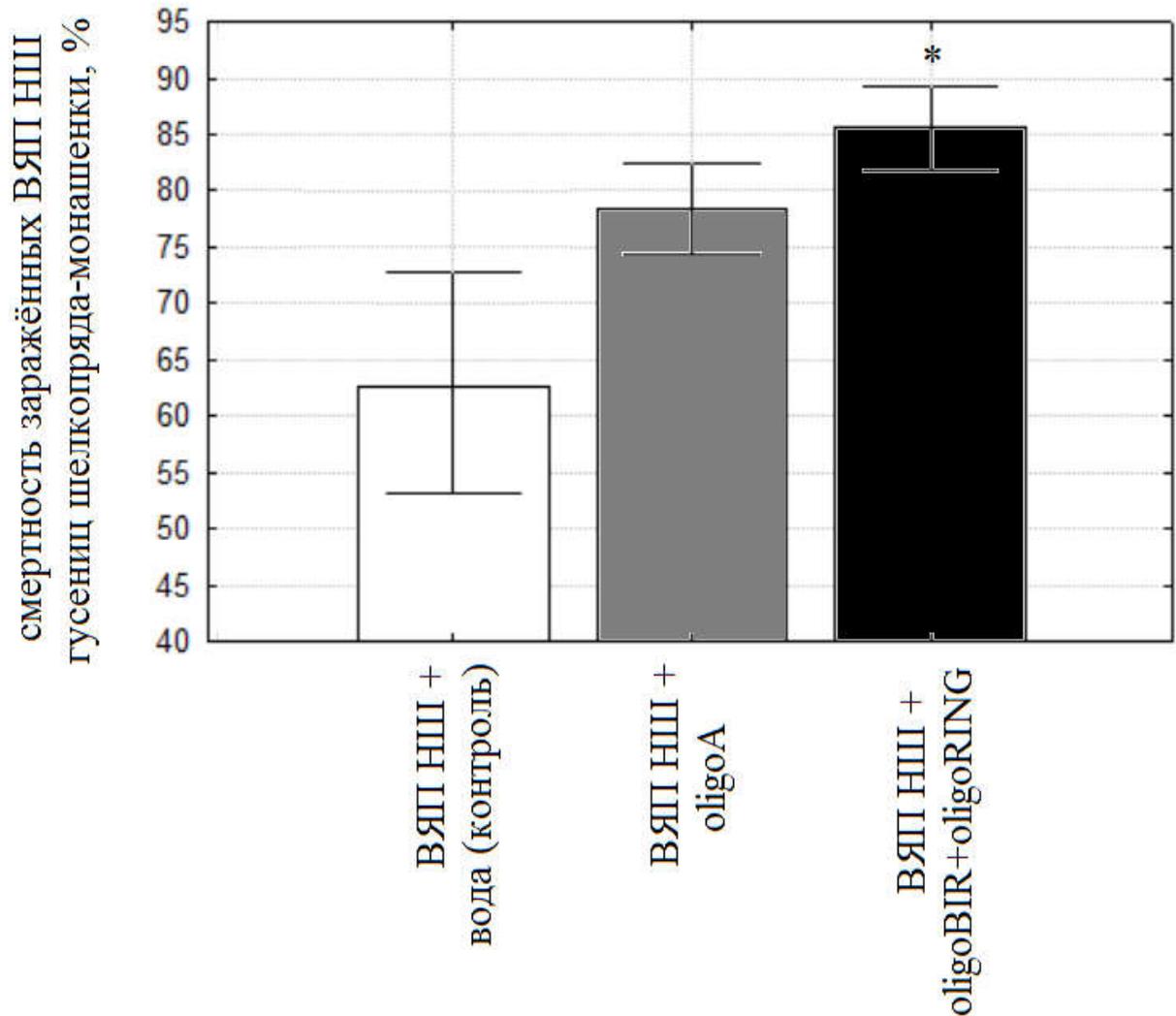


Рисунок 4.5 – Средняя смертность заражённых ВЯП НШ гусениц шелкопряда-монашенки через 11 суток после их контактной обработки водой и ДНК-олигонуклеотидами: "oligoA" и "oligoBIR+oligoRING". Достоверность смертности насекомого в группе "oligoRING" против контроля обозначена \* при  $p < 0,05$ . Эффективность заражения гусениц ВЯП НШ была показана методом ПЦР со специфическими праймерами к гену капсида р39 ВЯП НШ (подраздел 2.7) и составила 33,3% на 5-е сутки после окончания 2-дневного периода заражения

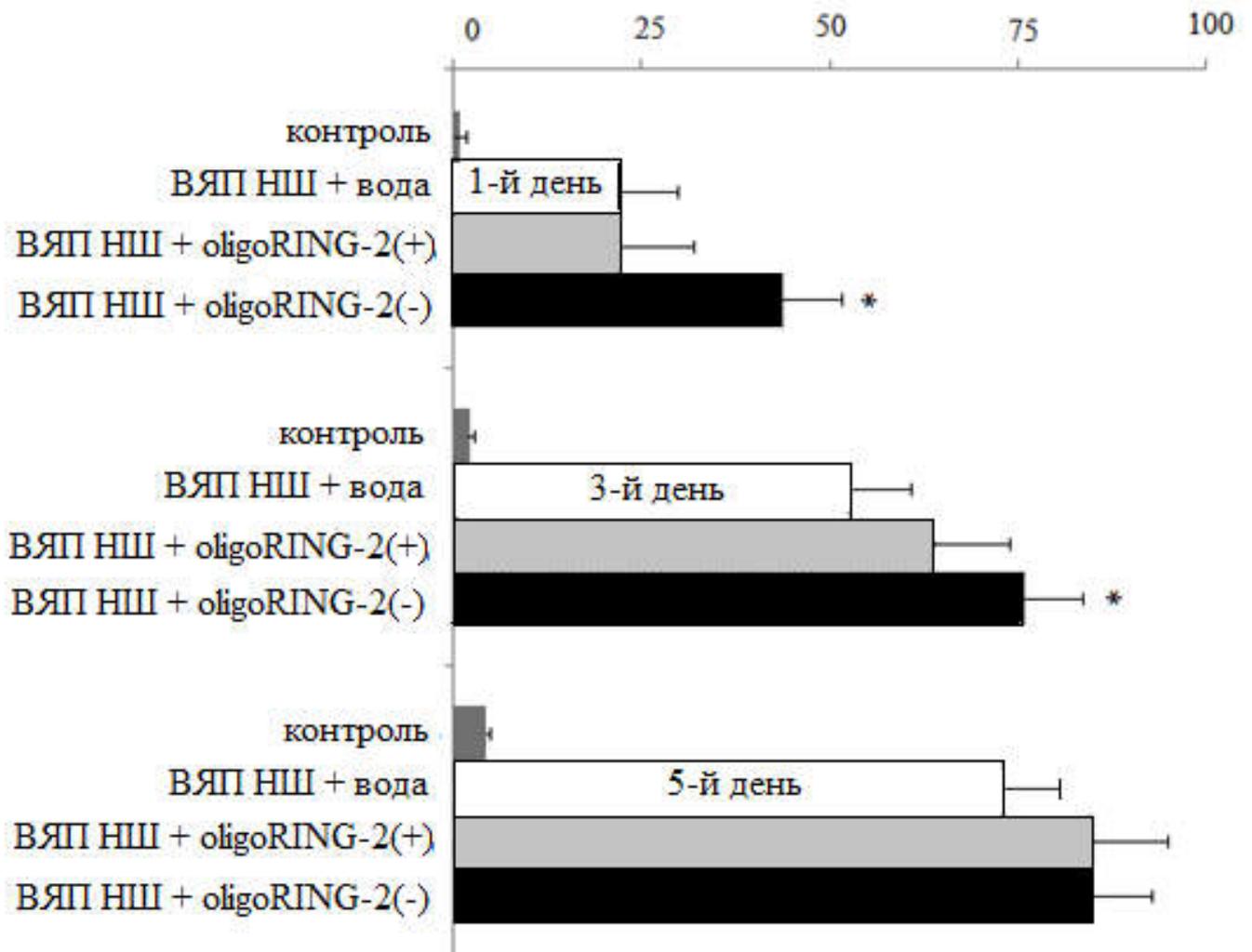


Рисунок 4.6 – Динамика смертности заражённых ВЯП НШ гусениц непарного шелкопряда в течение 5-дневного периода, к которым ДНК-олигонуклеотиды попали кишечным путём. Достоверность смертности насекомого в группе "oligoRING-2(-)" против заражённого контроля обозначена \* при  $p < 0,05$

Нужно отметить, что также был получен инсектицидный эффект при пероральном введении антисмыслового oligoRING-фрагмента антиапоптозного IAP-2-гена ВЯП НШ (5'-TGA ACT CGA CGC TCT TGT CC-3') в организм насекомого. Путём кормления гусеницы непарного шелкопряда из одной яйцекладки в течение суток получили дозу в  $10^4$  вирусных полиэдров и через 4 суток после окончания 1-дневного периода заражения со свежими листьями дуба получили 75 пмоль ДНК-фрагмента каждая. ДНК-олигонуклеотид был

распределён пипеточным дозатором по листу дуба пушистого. В качестве контрольного ДНК-олигонуклеотида был применён смысловой фрагмент антиапоптозного IAP-2-гена ВЯП НШ (5'- CGC GCG TCC ATT TTC TTC AT-3'). Достоверная смертность заражённых ВЯП НШ гусениц в группе "oligoRING" была зафиксирована уже через 24 часа и составила 44,2% против 22,1% в контрольной группе ( $\chi^2=4,05$ ;  $df=1$ ;  $N=120$ ;  $p<0,05$ ) (Рисунок 4.6). В течение следующих 2-х суток смертность в группах эксперимента повысилась и составила 76,9%, 64,2% и 53,1% в группе "oligoRING-2(-)", группе "oligoRING-2(+)" и контрольной группе соответственно. Достоверность в смертности была обнаружена только между гусеницами группы "oligoRING-2(-)" и контрольной группы ( $\chi^2=4,85$ ;  $df=1$ ;  $N=120$ ;  $p<0,05$ ). На 5-е сутки после обработки ДНК-олигонуклеотидами смертность между группами эксперимента перестала быть достоверной между группой "oligoRING-2(-)" и контрольной группой. Очевидно, что это происходило в результате контакта oligoRING-фрагмента с покровами гусениц во время их кормления, так как в кишечнике насекомых содержатся диэстеразы (нуклеазы), которые разрушают попавшие с пищей олигонуклеотиды.

#### **4.2 Снижение биомассы гусениц, которых заразили ВЯП НШ в лабораторных условиях**

Было исследовано накопление биомассы заражёнными гусеницами непарного шелкопряда после обработки ДНК-олигонуклеотидами (Рисунок 4.7).

Уже на 7-е сутки в экспериментальной группе "oligoRING" было обнаружено достоверное снижение биомассы гусениц, и средняя масса составила  $1,72 \pm 0,05$  мг ( $n=15$ ) против  $2,55 \pm 0,07$  мг ( $n=28$ ) в контроле ( $p<0,05$ ). Напротив, в группе "oligoCrG" было зафиксировано достоверное повышение биомассы на 7-е и 14-е сутки 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 ( $p<0,05$ ).

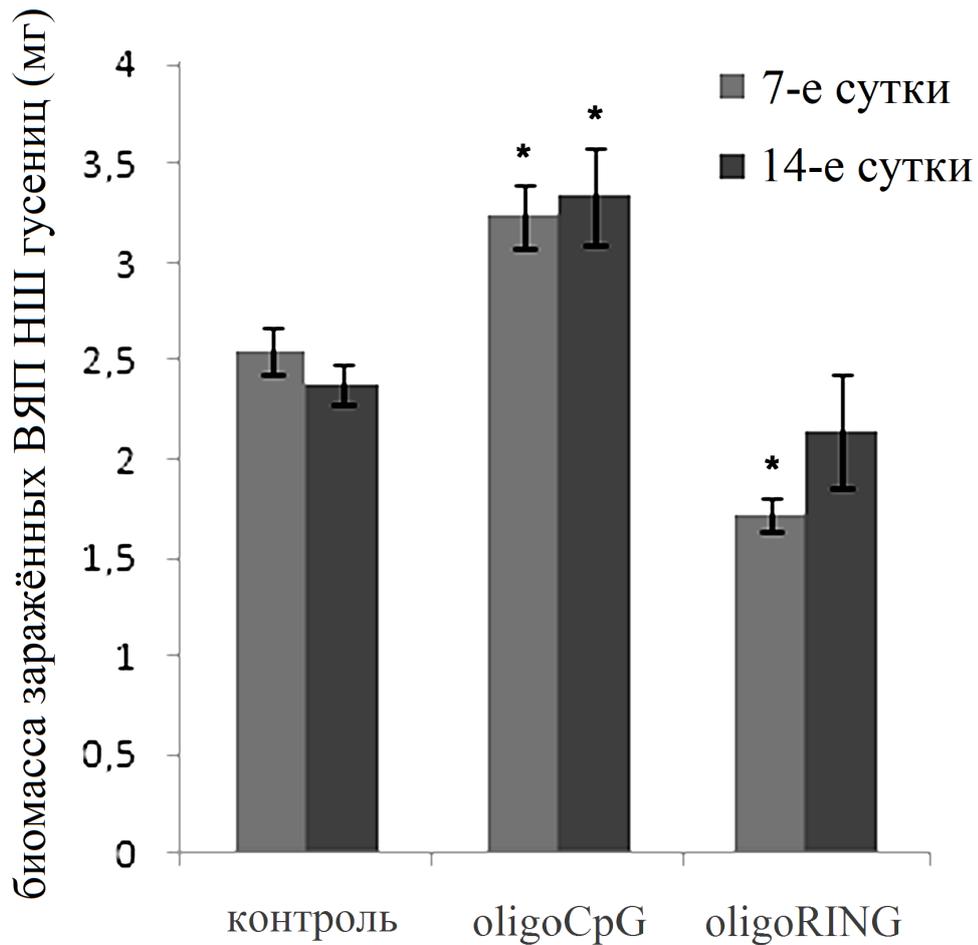


Рисунок 4.7 – Динамика накопления биомассы заражёнными ВЯП НШ гусеницами шелкопряда после их контактной обработки oligoRING-фрагментом, oligoCpG-фрагментом и водой. Достоверность снижения биомассы насекомого в группе "oligoRING" против контроля обозначена \* при  $p < 0,05$

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

Таким образом, как и в случае с безвирусными гусеницами, под действием oligoRING-фрагмента IAP-3-гена ВЯП НШ снижается биомасса заражённых бакуловирусом насекомых. Это также является важным показателем высокого инсектицидного потенциала oligoRING-фрагмента, который повышает уровень апоптотических процессов в клетках насекомого, при этом каждая погибшая клетка снижает биомассу шелкопряда. Стадия гусеницы сопровождается

постоянным ростом биомассы насекомого (от гусеницы I возраста до куколки – масса увеличивается в 500-1000 раз), поэтому снижение этого показателя говорит только об ухудшении физиологического состояния вредителя.

### 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 (Оберемок, 2008b; Бахвалов, 2012), особенно в местах интенсивных обработок бакуловирусными препаратами. В таких случаях осуществлять контроль вредителя можно, обрабатывая гусениц oligoRING-фрагментом без предварительного заражения вирусом. Насекомые, заражённые в природе, были обработаны ДНК-олигонуклеотидами (30 пмоль/гусеницу) на стадии гусениц II возраста (Таблица 4.4).

Таблица 4.4 – 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%*

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

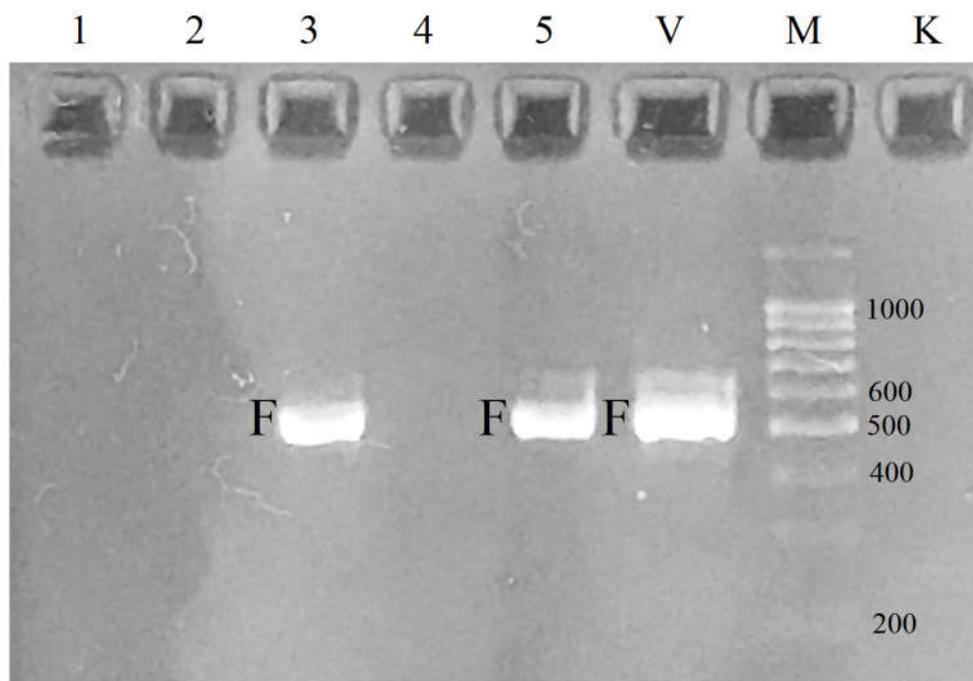


Рисунок 4.8 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК заражённых ВЯП НШ гусениц непарного шелкопряда I возраста, полученные с использованием праймеров для детекции ДНК ВЯП НШ (подраздел 2.7): К – отрицательный контроль; М – маркер молекулярных весов ДНК (с шагом в 100 п.н.); 1-5 – индивидуальные электрофоретические спектры особей; V – (положительный контроль); F – маркер вирусной ДНК длиной 524 п.н., ДНК вируса выделена из препарата "Вирин НШ" (Россия)

Заражённость гусениц I возраста, вылупившихся из инфицированных ВЯП НШ яиц насекомого, была показана методом ПЦР со специфическими праймерами к гену капсида р39 ВЯП НШ (подраздел 2.7) и составила 40% (Рисунок 4.8). Бакуловirus повсеместно встречаются в природе, являясь важным регулятором численности чешуекрылых. Это делает их перспективными кандидатами для биологической борьбы с насекомыми-вредителями, действующими эффективно, но медленно. Результаты данной работы показывают, что антисмысловый oligoRING-фрагмент может повышать смертность заражённых в природе ВЯП НШ гусениц непарного шелкопряда достаточно

быстро, через 5 суток после применения ( $\chi^2=12,7$ ;  $df=1$ ;  $N=127$ ;  $p<0,05$ ), увеличивая этим эффективность действия бакуловирусных препаратов. Таким образом, на следующий год после обработки бакуловирусными препаратами, на том же участке леса возможно применение oligoRING-фрагмента антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ в качестве ДНК-инсектицида для гусениц, которые получили бакуловирус трансвариально или заразились им в природе.

Нужно отметить, что западные учёные акцентируют внимание на возможном ингибировании эндогенными вирусами процесса РНК-интерференции у вредителей (например, при введении двухцепочечных фрагментов в насекомое пероральным путём), особенно у чешуекрылых, например, при помощи вирусных белков-супрессоров (Terenius et al., 2011; Swevers et al., 2013). Это может обуславливать устойчивость к РНК-препаратам, основанных на РНК-интерференции. В такой ситуации контактное применение коротких антисмысловых фрагментов антиапоптозных генов бакуловирусов может помочь разрешить эту проблему и успешно контролировать численность заражённых бакуловирусами гусениц. И хотя дополнительная обработка ДНК-инсектицидом после применения бакуловирусного препарата не представляется экономически выгодным мероприятием, вместе с тем, оно повышает эффективность применения бакуловируса. При определённых условиях – когда насекомое уже заражено бакуловирусом – предлагаемый подход может существенно понизить уровень затрат на защиту растений от целевого вредителя.

## 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, 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). В клетках антисмысловые олигонуклеотиды способны влиять на их функционирование через блокировку экспрессии целевых генов по механизму действия РНКазы Н-зависимых антисмысловых олигонуклеотидов (Sharma et al., 2014). Именно степень экспрессии определённых генов на молекулярном уровне обуславливает функциональность клеток и в конечном итоге определяет их судьбу, а иногда и склоняет весы в сторону гибели или дальнейшей жизни клетки. 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 в виде ДНК-инсектицидов.

#### 5.1 Безвирусные гусеницы непарного шелкопряда

##### 5.1.1 Доказательство проникновения oligoRING-фрагмента в клетки непарного шелкопряда

Были проведены исследования с целью доказательства проникновения oligoRING-фрагмента в ткани шелкопряда после контактной обработки (Рисунок 5.1).

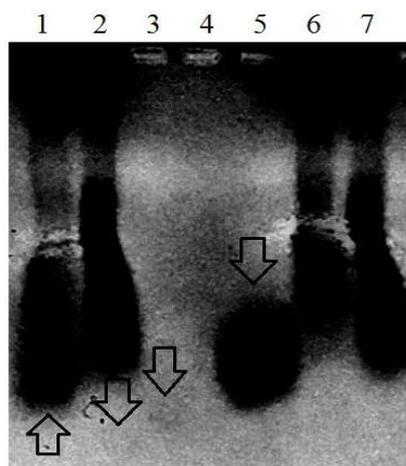


Рисунок 5.1 – Электрофореграмма тотальной ДНК особей непарного шелкопряда 2-го личиночного возраста: 1 – две особи (№1), контактно обработанные по 3,5 мкл oligoRING-фрагмента в концентрации 100 пмоль/мкл и через 2,5 часа лизированные в 30 мкл гуанидина тиоцианата ("ДНК-сорб АМ", Амплисенс, Москва), после этого добавлено 70 мкл воды и для электрофореза отобрано 10 мкл гомогената; 2 – две особи (№2), контактно обработанные по 3,5 мкл oligoRING-фрагмента в концентрации 100 пмоль/мкл и через 2,5 часа последовательно отмытые ТЕ-буфером (200 мкл) ("ДНК-сорб АМ", Амплисенс, Москва) и дистиллятом (100 мкл), а после этого гомогенизированные в 30 мкл гуанидина тиоцианата, после этого добавлено 70 мкл воды и для электрофореза отобрано 10 мкл гомогената; 3 – 5% от содержимого ТЕ-буфера (200 мкл) для отмытки особей № 2; 4 – 10% содержимого дистиллята для отмытки особей № 2 (100 мкл); 5 – oligoRING-фрагмент (350 пмоль/лунку); 6 – две особи (№3), обработанные по 3,5 мкл дистиллированной воды и через 2,5 часа лизированные в 30 мкл гуанидина тиоцианата, после этого добавлено 70 мкл воды и для электрофореза отобрано 10 мкл гомогената; 7 – две особи (№4), обработанные по 5 мкл дистиллированной воды и через 2,5 часа отмытые ТЕ-буфером (200 мкл) ("ДНК-сорб АМ", Амплисенс, Москва) и дистиллятом (100 мкл), а после этого гомогенизированные в 30 мкл гуанидина тиоцианата ("ДНК-сорб АМ", Амплисенс, Москва), после этого добавлено 70 мкл воды и для электрофореза отобрано 10 мкл гомогената. Стрелочками обозначены места локализации oligoRING-фрагмента

Особь №2 были обработаны oligoRING-фрагментом в концентрации 350 пмоль/гусеницу. Через 2,5 часа они были отмыты от олигонуклеотида дважды: первый раз с использованием 200 мкл ТЕ-буфера, а во второй раз – с добавлением 100 мкл дистиллята. После гомогенизации гусениц в лизирующем растворе и центрифугирования супернатант был использован для электрофореза тотальной ДНК насекомого в агарозном геле. У данных особей была обнаружена фракция oligoRING-фрагмента, которая была также найдена в отмывочном растворе ТЕ-буфера, однако она несколько уступала ей в длине. Это связано с тем, что ТЕ-буфер незначительно уменьшил отрицательный заряд молекул oligoRING-фрагмента в пробе №3. Во втором отмывочном растворе с дистиллятом фракция oligoRING-фрагмента отсутствовала, поэтому ДНК-олигонуклеотид мог попасть в пробу №2 только из тканей насекомого, что доказывает проникновение олигонуклеотида через покровную ткань в организм вредителя. Контрольные особи (№3 и №4), обработанные водой, не имели близкой по длине oligoRING-фрагменту фракции ДНК.

Таким образом, наблюдаемые биологические эффекты, которые возникают в ответ на контактное применение oligoRING-фрагмента, связаны с внутриклеточными процессами. Очевидно, что основную роль в этих процессах должно играть комплементарное взаимодействие oligoRING-фрагмента с целевой мРНК антиапоптозного гена хозяина – непарного шелкопряда, которое ведёт к последующей деградации молекулы мРНК и снижение экспрессии антиапоптозного гена. Именно так действуют в клетках антисмысловые олигонуклеотиды (Dias, 2002; Sharma et al., 2014).

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. Деградация антисмыслового oligoRING-фрагмента клеточными дезоксирибонуклеазами 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 пользу такого объяснения свидетельствует установленный нами факт, что присутствие ВЯП НШ (как возможного природного стресс-фактора) в организме насекомого в течение 14 суток достоверно повышает экспрессию хозяйского гена IAP-1 в  $3,45 \pm 0,86$  раза по сравнению с безвирусным контролем ( $n=6$ ;  $p < 0,05$ ).

### **5.1.2 Снижение экспрессии антиапоптозного IAP-1-гена непарного шелкопряда под действием oligoRING-фрагмента антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ**

Данные полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР РВ) показали тенденцию ( $p < 0,12$ ) к снижению экспрессии антиапоптозного IAP-1-гена шелкопряда и запуск в клетках насекомого апоптотических процессов в ответ на применение oligoRING-фрагмента. Случайный oligoCpG-фрагмент не проявил такого действия (Рисунок 5.2). Полученные результаты согласуются с обсуждаемыми выше данными о том, что oligoRING-фрагмент вызывает снижение жизнеспособности и биомассы безвирусных насекомых (раздел 3).

Было сделано предположение, что антисмысловой oligoRING-фрагмент работает по классическому механизму действия антисмысловых РНКазы Н-зависимых олигонуклеотидов (Dias, 2002), вызывая деградацию мРНК целевого антиапоптозного гена и способствуя развитию апоптотических процессов, которые приводят к гибели клеток и всего насекомого. Геном непарного шелкопряда был исследован на наличие в нём антиапоптозных генов, которые гомологичны IAP-3-гену ВЯП НШ. ПЦР с oligoBIR-фрагментом и oligoRING-фрагментом IAP-3-гена ВЯП НШ в качестве праймеров помогли выявить несколько частей генома непарного шелкопряда. Нужно отметить, что идея

использования oligoBIR-фрагмента и oligoRING-фрагмента для поиска неизвестных антиапоптозных генов системы взаимоотношений вирус-хозяин является новой и в данном исследовании показала свою состоятельность при поиске антиапоптозных генов непарного шелкопряда.

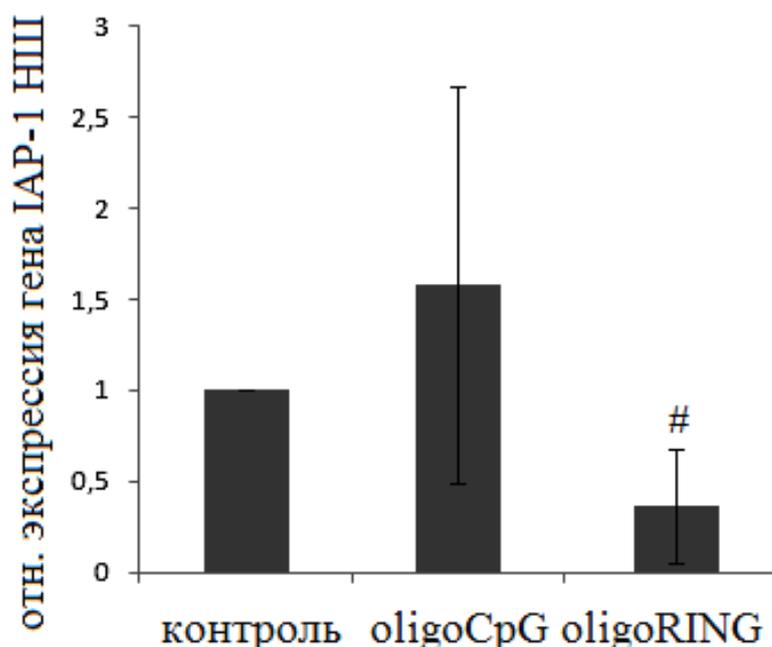


Рисунок 5.2 – Относительная экспрессия антиапоптозного IAP-1-гена у выращенных в лаборатории безвирусных гусениц шелкопряда на 14-е сутки после обработки водой и одноцепочечными ДНК-фрагментами (oligoRING-фрагментом и oligoCpG-фрагментом) в концентрации 3 пмоль/гусеницу. В каждой группе было проанализировано по 6 особей. Экспрессия IAP-1-гена в контрольных группах (вода) взята за 1 (100%). Существенное, но недостоверное снижение экспрессии IAP-1-гена насекомого в группе "oligoRING" против контрольной группы обозначено # при  $p < 0,12$

В ходе ПЦР были получены ампликоны разной длины. Для ДНК-секвенирования был взят S-фрагмент длиной 202 п.н., который был заметнее других (Рисунок 5.3). Секвенированный участок геномной ДНК шелкопряда (IAP-X-ген) был выровнен относительно IAP-3-гена ВЯП НШ и показал высокий

уровень гомологии с последним. Две последовательности совпадают на 59% (Рисунок 5.4).

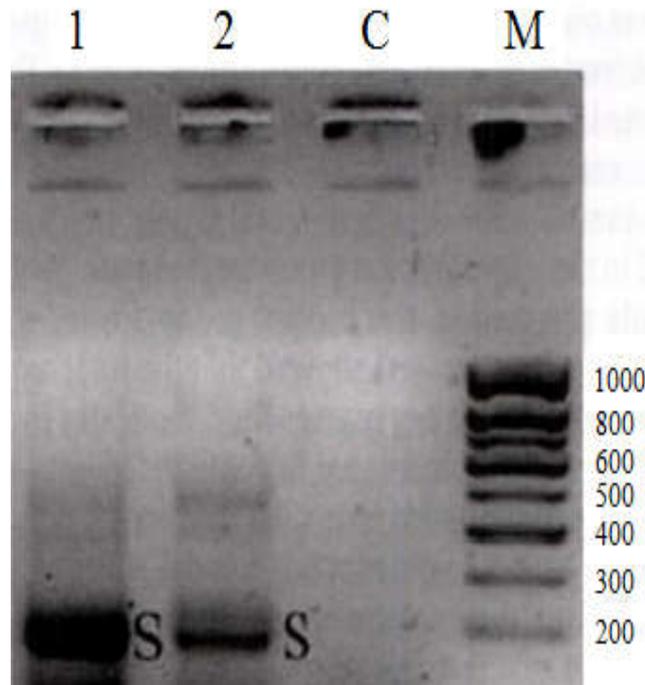


Рисунок 5.3 – Продукты амплификации ДНК непарного шелкопряда с oligoBIR-фрагментом и oligoRING-фрагментом в качестве праймеров: 1-2 – индивидуальные спектры насекомых; С – контроль; М – маркер молекулярных весов ДНК

Эти данные позволяют говорить о том, что обнаруженный фрагмент генома шелкопряда является частью одного из его антиапоптозных генов (интроны в составе фрагмента IAP-X-гена могли снизить процент сходства между гомологичными генами). Сам по себе секвенированный ДНК-фрагмент генома непарного шелкопряда отсутствует в базе данных GenBank, так как геном насекомого не секвенирован полностью. Поиск при помощи программы TBLASTX (Zhang et al., 2000) в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей непарного шелкопряда сходных секвенированному фрагменту обнаружил весомое сходство с мРНК антиапоптозного гена IAP-1 насекомого (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/409924403>) и имеет 20%-ное

перекрытие с ним. Однако на поверхности мРНК гена IAP-1 шелкопряда не содержится комплементарная oligoRING-фрагменту последовательность.

```

ВЯП НШ IAP-3  GCCGGCGGAACTGGCCCACGCGGGCTTCTATTGCGC---GAACCGCCAAGATTTTGTGAA
НШ IAP-X      ----GATTAACTCGCC-----ATTACACACTAGACCACCAGA----CGCTCA
              *   ****  *          * * * *   * * * *   * *
              *
ВЯП НШ IAP-3  GTGCGCCTATTGCCACATCGAAATCGGCAATTGGTCGATCGGCAGCGACGCCATGTCCGA
НШ IAP-X      GCGCACCTCATCCACGCGGAGATTCTCGACACGTC--CCGTCATCACTAGCAAGCCCAG
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
              *
ВЯП НШ IAP-3  CCACAAGCGCTA---CTCGCCCCGTTGCCGGTTCGTCTGCGAGCTCATAAAGA-GGCCCG
НШ IAP-X      CAGTAATAGTTACAGCTCACTCATCTG-CATTCCTTCTCCTAACATTCCAGGACAGCCCC
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
              *
ВЯП НШ IAP-3  TGTGCGCCGGTCGAGCGCCGAGACGACGACGACGAAGACGACGAGGAGGACTCGGCCGCCG
НШ IAP-X      T-----GGACACGACCCTTG
              *                                  * * * * * * * *
              *
ВЯП НШ IAP-3  AGCCCGCCCGCGGGCGGCGAGCTGCTGTGTCTCCGTTTGCCTGGACGCGCAACGCGAAATAA
НШ IAP-X      G-----GTGCCCCG-----AAGA-
              * * * * * * * * * * * * * * * * * *
              *
ВЯП НШ IAP-3  TGTTTTCGCCGTGCCACCACGTCG
НШ IAP-X      -----CGCCGTGCCACCACGTCG
              * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

Рисунок 5.4 – Последовательность секвенированного фрагмента генома непарного шелкопряда (фрагмент IAP-X-гена НШ), выровненного по фрагменту IAP-3-гена ВЯП НШ. Звёздочками (\*) отмечены места совпадений

Таким образом, мРНК IAP-1-гена не является той целевой матрицей, которая при участии oligoRING-фрагмента и РНКазы H запускает апоптотические процессы в клетке насекомого и, очевидно, снижение экспрессии IAP-1-гена стоит ниже в каскаде биохимических реакций, приводящих к гибели клеток шелкопряда. Полученные данные ДНК-секвенирования указывают на то, что в безвирусных клетках насекомого в цитоплазме клеток может содержаться мРНК другого антиапоптозного гена хозяина с комплементарной oligoRING-фрагменту последовательностью, обладающей более высокой гомологией с IAP-3-геном ВЯП НШ (Hughes, 2002).

В этой связи решалась задача обнаружения целевого антиапоптозного гена (IAP-Z-гена) непарного шелкопряда, на экспрессию которого oligoRING-фрагмент будет действовать по механизму РНКазы Н-зависимых антисмысловых олигонуклеотидов (Sharma et al., 2014). Другими словами, отсутствие в клетках непарного шелкопряда мРНК целевого антиапоптозного гена ставило бы под сомнение специфичность обнаруженных эффектов в 3-м разделе диссертации (увеличение смертности, снижение биомассы, уменьшение количества самок в поколении, увеличение содержания кальция и магния в тканях).

### **5.1.3 Обнаружение антиапоптозного IAP-Z-гена шелкопряда, обладающего высокой степенью гомологии с антиапоптозным IAP-3-геном ВЯП НШ, и снижение его экспрессии под влиянием oligoRING-фрагмента**

Филогенетический анализ показал, что в ходе эволюции антиапоптозные гены, как и многие другие гены, были заимствованы вирусами ядерного полиэдроза у их хозяев и являются гомологичными им (Rollie, 2013), а иногда имеют с ними потрясающую схожесть (Cerio et al., 2010). При помощи oligoBIR-фрагмента и oligoRING-фрагмента IAP-3-гена ВЯП НШ в качестве праймеров был получен ампликон на кДНК безвирусных особей шелкопряда (Рисунок 5.5), длина которого составила 290 п.н. Ампликон был секвенирован.

Результаты секвенирования показали, что в безвирусных клетках непарного шелкопряда имеется целевая мРНК антиапоптозного гена (названного IAP-Z-геном), которая обладает высокой степенью гомологичности антиапоптозному IAP-3-гену ВЯП НШ и имеет комплементарный oligoRING-фрагменту участок (Рисунок 5.6). Таким образом, в безвирусных клетках непарного шелкопряда младших личиночных возрастов содержится целевая мРНК. По-видимому, кодирующий данную мРНК ген, включает в себя не только экзоны, но и интроны, так как на тотальной геномной ДНК oligoBIR-фрагмент и oligoRING-фрагмент в качестве праймеров не формируют ампликон длиной 290 п.н. Секвенированный фрагмент IAP-X-гена НШ (Рисунок 5.4) может быть участком этого гена.

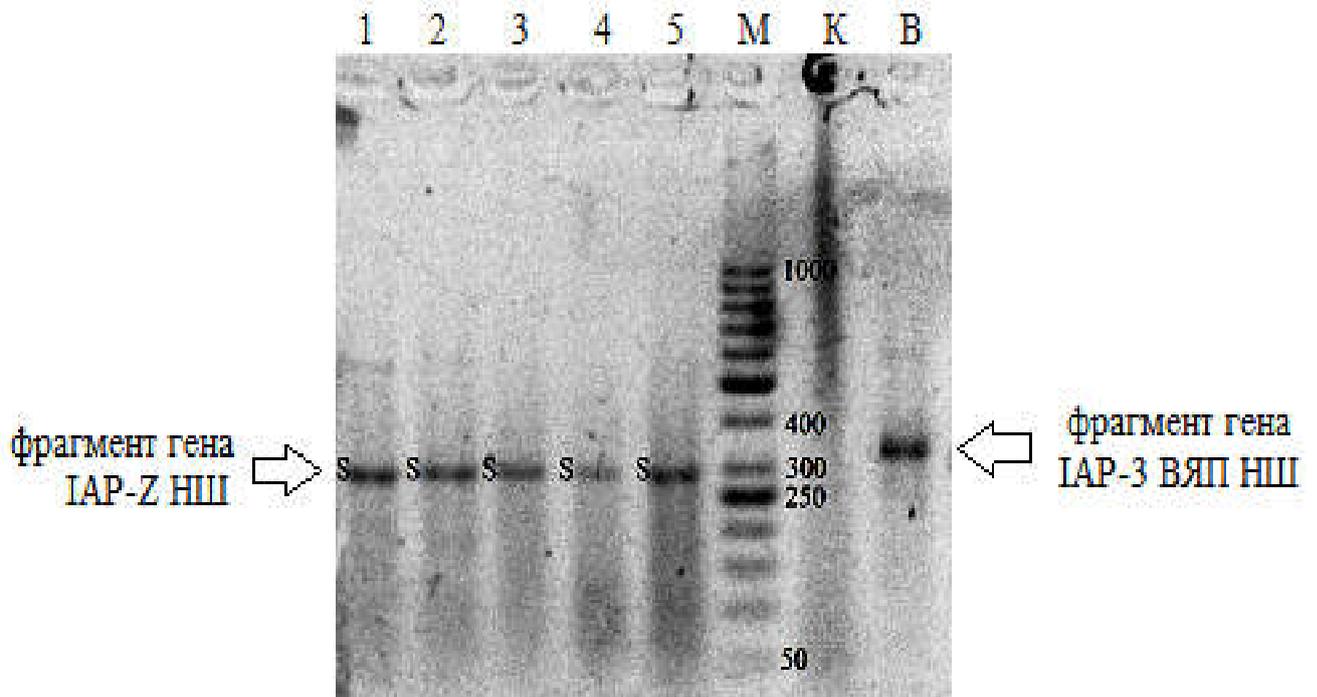


Рисунок 5.5 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК с oligoBIR-фрагментом (смысловый фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ; 5'-GCC GGC GGA ACT GGC CCA-3') и oligoRING-фрагментом (антисмысловый фрагмент антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ; 5'-CGA CGT GGT GGC ACG GCG-3' в качестве праймеров, которые были получены на кДНК безвирусных клеток шелкопряда: 1-5 – ампликоны фрагмента IAP-Z-гена непарного шелкопряда (НШ); М – маркер молекулярных весов ДНК; К – отрицательный 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), полученный при помощи oligoBIR-фрагмента и oligoRING-фрагмента в качестве праймеров

Методом ОТ-ПЦР РВ обнаружено достоверное снижение в  $2,2 \pm 0,1$  раза экспрессии целевого антиапоптозного IAP-Z-гена в насекомых на 14-е сутки после обработки антисмысловым oligoRING-фрагментом (Рисунок 5.7). Таким образом, oligoRING-фрагмент достоверно снижает экспрессию антиапоптозного

IAP-Z-гена и, очевидно, как следствие, заметно снижает экспрессию IAP-1-гена непарного шелкопряда, запуская апоптотические процессы в клетках.

```

НШ IAP-Z GAGAAGCGGACGCCAAGATTTTGTGAGTGGCCCTATTGCCACATCGAAATCGGCAATTGG
ВЯП НШ IAP-3 ---CCTCACGACGCCAGATTTTGTGAGTGGCCCTATTGCCACATCGAAATCGGCAATTGG
          *           *  *****

НШ IAP-Z TCGATCGGCAGCGACGCCATGTCCGACCACAAGCGCTACTCGCCCGCTTGCCGGTTCGTC
ВЯП НШ IAP-3 TCGATCGGCAGCGACGCCATGTCCGACCACAAGCGCTACTCGCCCGCTTGCCGGTTCGTC
          *****

НШ IAP-Z TCGGAGCTCATAAAGAGGCCCGTGTGCGCCGGTCGAGCGGCGAGACGACGACGACTAAGAC
ВЯП НШ IAP-3 TCGGAGCTCATAAAGAGGCCCGTGTGCGCCGGTCGAGCGGCGAGACGACGACGACGAAGAC
          *****

НШ IAP-Z GACTACGAGGAGGACTCGGTGCGCCGAGCCCGCCCGCGGCGGCGAGCTGCTGTGCTCCGTT
ВЯП НШ IAP-3 GACGAGGACTCGGGCGC ---CGCCGAGCCCGCCCGCGGCGGCGAGCTGCTGTGCTCCGTT
          *** * **  ** * *  *****

НШ IAP-Z TGCCTGGACGCGCAACGCGAAATAATGTTTTGCGCGTGCCACCACGTCGA-----
ВЯП НШ IAP-3 TGCCTGGACGCGCAACGCGAAATAATGTTTTGCGCGTGCCACCACGTCGACGTCGG
          *****

```

комплементарен oligoRING

Рисунок 5.6 – Последовательность секвенированного фрагмента IAP-Z-гена непарного шелкопряда, выровненного по фрагменту IAP-3-гена ВЯП НШ.

Звёздочками (\*) отмечены места совпадений

Известно, что в клетке существуют белки системы апоптоза–антиапоптоза. Преобладание белков антиапоптоза сдерживает клетку от запрограммированной гибели, а преобладание апоптотических белков – наоборот (Агол, 1997). 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. Заблокированная экспрессия антиапоптозного IAP-Z-гена инициирует апоптотический сигнал в клетке. При массовой гибели клеток от апоптоза погибает и целый организм насекомого. В этом и состоит механизм инсектицидного действия oligoRING-фрагмента.

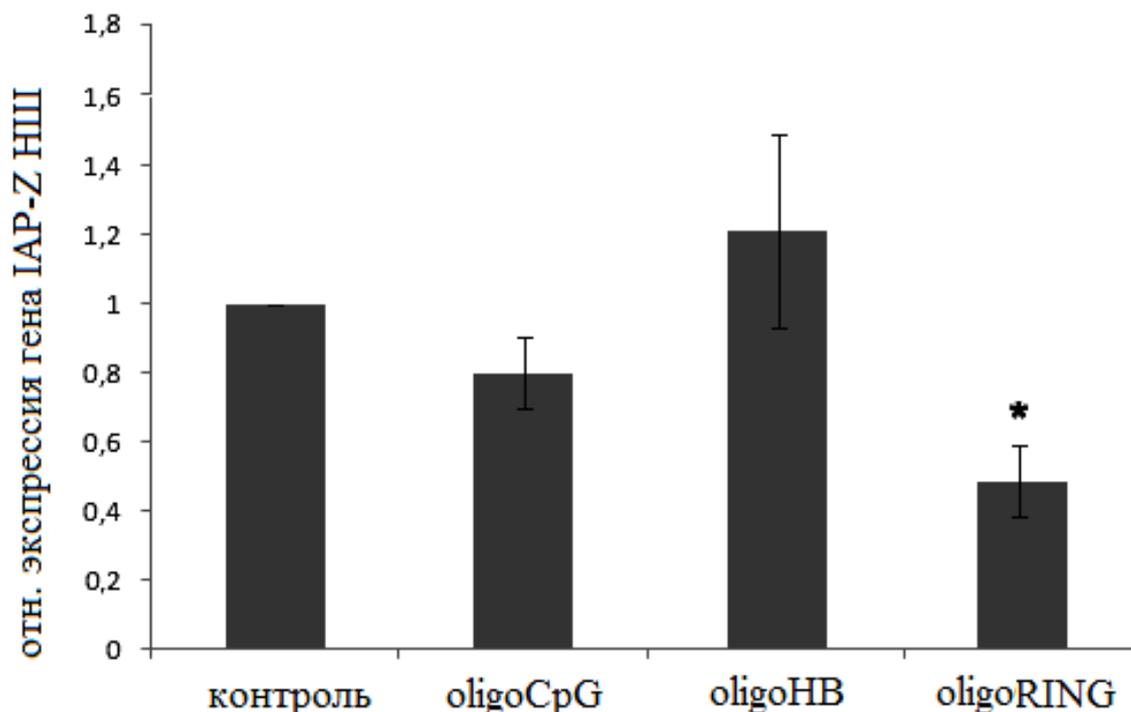


Рисунок 5.7 – Относительная экспрессия антиапоптозного IAP-Z-гена у выращенных в лаборатории безвирусных гусениц непарного шелкопряда на 14-е сутки) после обработки водой и одноцепочечными ДНК-фрагментами: oligoRING-фрагментом, oligoCpG-фрагментом и oligoHB-фрагментом (5'-GCT GCA CCA CCG TGC CGC-3') в концентрации 3 пмоль/гусеницу. Гусеницы были выращены из одной яйцекладки. В каждой группе было проанализировано по 6 особей (n=6). Экспрессия IAP-Z-гена в контрольных группах (вода) взята за 1 (100%). Снижение экспрессии IAP-Z-гена насекомого в группе oligoRING против контроля обозначено \* при  $p < 0,05$

Полученные данные согласуются с результатами, достигнутыми при пульверизации гусениц кукурузного мотылька *Ostrinia furnacalis* Guenée водным раствором, содержащим фрагменты дцРНК для инактивации экспрессии генов по механизму РНК-интерференции (Wang et al., 2011), что привело к снижению экспрессии целевых генов, а также к достоверно повышенной смертности насекомого. Таким образом, благодаря своему строению и уникальной последовательности, оцДНК-фрагменты и дцРНК-фрагменты могут стать новым инструментом избирательного контроля численности чешуекрылых-вредителей.

Для оценки продолжительности действия oligoRING-фрагмента на клетки насекомого (3 пмоль/гусеницу) был применён анализ уровня экспрессии IAP-Z-гена на имаго выживших самок и самцов, которые были обработаны на стадии гусениц (раздел 3, Рисунок 3.11). Было обнаружено достоверное снижение экспрессии IAP-Z-гена в самках группы "oligoRING", а в самцах экспрессия целевого антиапоптозного гена была настолько снижена, что не поддавалась детекции (Таблица 5.1). Полученные результаты свидетельствуют о долгосрочном снижении экспрессии целевого антиапоптозного IAP-Z-гена под влиянием oligoRING-фрагмента.

Таблица 5.1 – Уменьшение (в количество раз) относительной экспрессии антиапоптозного IAP-Z-гена в имаго шелкопряда под влиянием ДНК-олигонуклеотидов

	контроль	oligoBIR	oligoRING
самцы	1	1,44 ± 1,2	не обнаружена
самки	1	4,5 ± 1,9	12,06 ± 1,48*

Примечание: достоверность уменьшения экспрессии IAP-Z-гена в группе "oligoRING" против контроля обозначена \* при  $p < 0,05$ ; экспрессия IAP-Z-гена в контрольных группах (вода) взята за 1 (100%); в каждой группе было проанализировано по 6 имаго

Нужно отметить, что достоверное снижение экспрессии IAP-1-гена у имаго по сравнению с контролем было обнаружено только для самцов (Таблица 5.2). В клетках самок, как и в клетках отложенных ими яиц, наблюдался компенсаторный эффект, выраженный в повышении экспрессии антиапоптозного IAP-1-гена (Рисунок 5.8). Таким образом, длительность и амплитуда снижения экспрессии антиапоптозных генов шелкопряда под действием oligoRING-фрагмента сильнее проявляется для целевого IAP-Z-гена. Достоверное снижение экспрессии целевого IAP-Z-гена соответствует "золотому стандарту" применения антисмысловых олигонуклеотидов, когда можно говорить о специфичности инсектицидного эффекта, вытекающего из комплементарного взаимодействия oligoRING-фрагмента с целевой мРНК (Dias, 2002).

Таблица 5.2 – Относительная экспрессия антиапоптозного IAP-1-гена в имаго шелкопряда под влиянием ДНК-олигонуклеотидов

	контроль	oligoBIR	oligoRING
самцы	1	1,09 ± 0,16	0,34 ± 0,22*
самки	1	4,62 ± 3,53	5,4 ± 3,63

Примечание: достоверность снижения экспрессии IAP-1-гена в группе "oligoRING" против контроля обозначена \* при  $p < 0,05$ ; экспрессия IAP-1-гена в контрольных группах (вода) взята за 1 (100%); в каждой группе было проанализировано по 6 имаго

Достоверно повышенной в яйцах шелкопряда оказалась экспрессия антиапоптозного IAP-1-гена (Рисунок 5.8) и апоптозного CASP-4-гена (Рисунок 5.9) в обеих группах эксперимента. Такие данные указывают на то, что эффект от контактной обработки ДНК-олигонуклеотидами переходит в следующее поколение, так как экспрессия генов системы апоптоза-антиапоптоза достоверно отличается от контроля. До определённой степени является непонятным действие

oligoBIR-фрагмента. Возможно, что эффект oligoBIR объясняется его неспецифическим действием или действием по типу миРНК, когда для инактивации экспрессии целевого гена необязательным является наличие во фрагменте совершенной комплементарной поверхности для взаимодействия с целевой мРНК (Рисунок 5.10). Тем не менее, инсектицидный эффект смыслового oligoBIR-фрагмента гораздо менее выражен, чем у антисмыслового oligoRING-фрагмента.

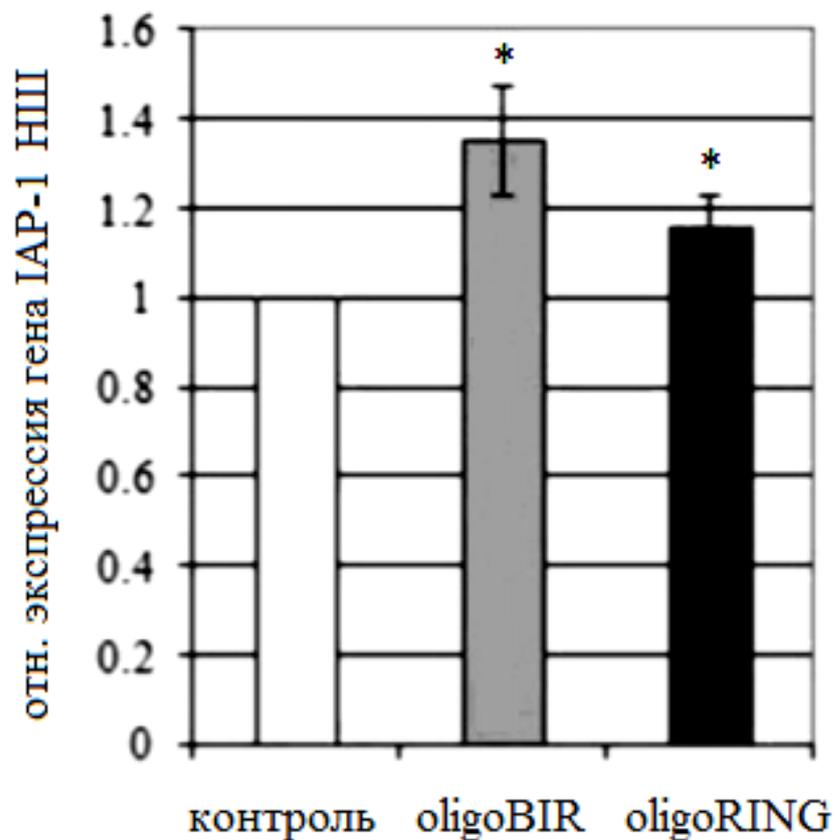


Рисунок 5.8 – Относительная экспрессия антиапоптозного IAP-1-гена в яйцах шелкопряда, которые были обработаны ДНК-олигонуклеотидами (oligoRING-фрагментом и oligoBIR-фрагментом) в концентрации 3 пмоль/гусеницу на стадии гусеницы I-II возраста. В каждой группе эксперимента было 3 повторности (по 100 яиц на 1 повторность). Экспрессия IAP-1-гена в контрольных группах (вода) взята за 1 (100%). Снижение экспрессии IAP-1-гена насекомого в группе "oligoRING" и группе "oligoBIR" против контроля обозначено \* при  $p < 0,05$

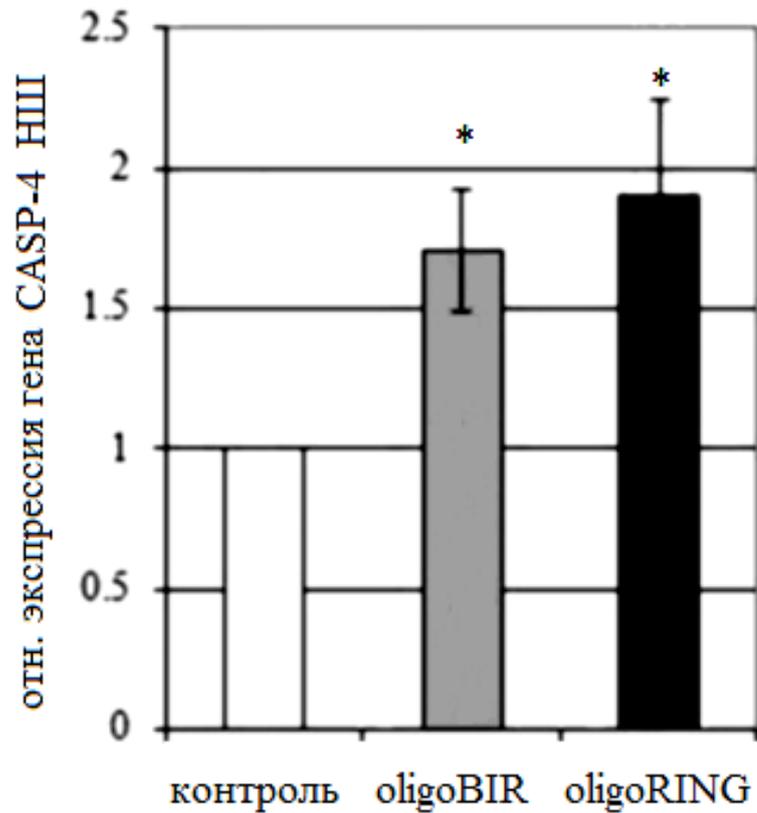


Рисунок 5.9 – Относительная экспрессия апоптозного CASP-4-гена в яйцах шелкопряда, которые были обработаны ДНК-олигонуклеотидами (oligoRING-фрагментом и oligoBIR-фрагментом) в концентрации 3 пмоль/гусеницу на стадии гусеницы I-II возраста. В каждой группе эксперимента было 3 повторности (по 100 яиц на 1 повторность). Экспрессия CASP-4-гена в контрольных группах (вода) взята за 1 (100%). Снижение экспрессии IAP-1-гена насекомого в группе "oligoRING" и "oligoBIR" против контроля обозначено \* при  $p < 0,05$

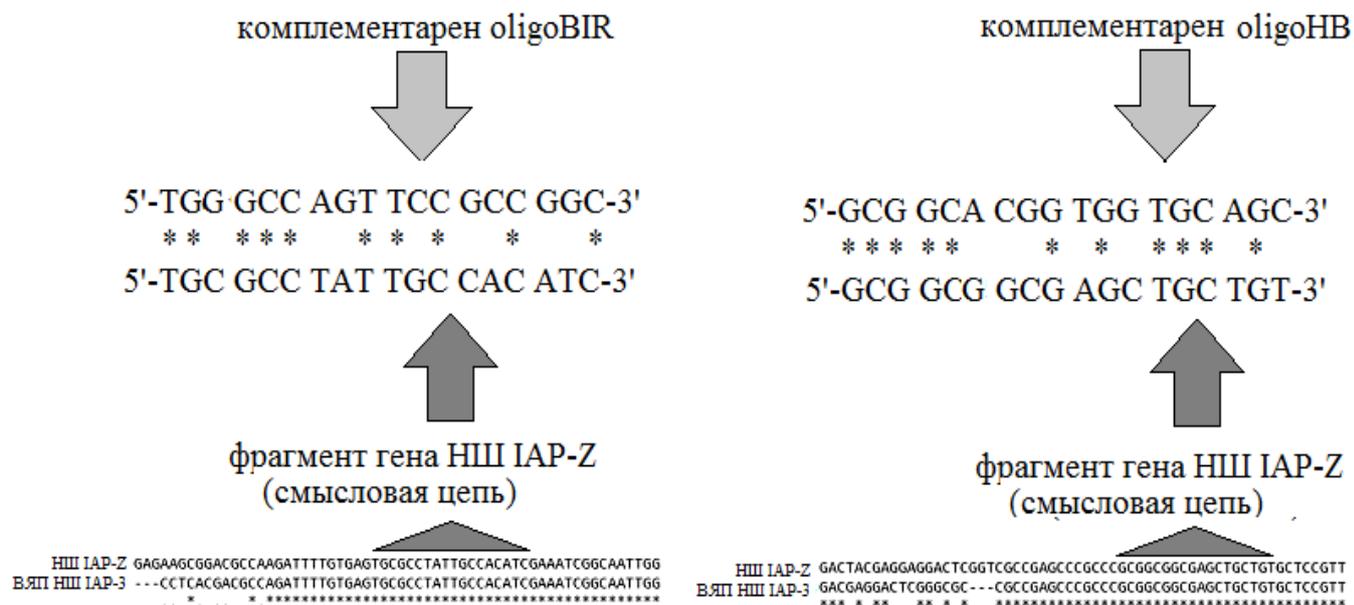


Рисунок 5.10 – Схема, объясняющая возможное несовершенное комплементарное взаимодействие oligoBIR-фрагмента и oligoHB-фрагмента с целевой мРНК IAP-Z-гена. На рисунке отмечены \* места совпадений нуклеотидов смысловой цепи IAP-Z-гена непарного шелкопряда и фрагмента мРНК, который комплементарен oligoBIR-фрагменту (10 совпадений из 18) и oligoHB-фрагменту (11 совпадений из 18). При несовершенном комплементарном взаимодействии oligoBIR-фрагмент и oligoHB-фрагмент будут слабее удерживаться на поверхности мРНК, чем в случае oligoRING-фрагмента, так как будет сформировано меньшее количество водородных связей, и, как следствие, инактивация экспрессии антиапоптозного IAP-Z-гена будет протекать реже

В 3-м разделе диссертации было показано, что в результате погружения личинок дрозофилы в раствор с концентрацией ДНК-олигонуклеотида 20 пмоль/мкл на 20 минут наблюдается снижение биомассы вышедших через 6-7 суток самок в группе "oligoRING-2(-)", а также имеет место более низкая частота формирования самок дрозофилы. Было обнаружено, что oligoRING-2(-)-фрагмент достоверно снижает экспрессию целевого DIAP-2-гена дрозофилы (Рисунок 5.11), нормальная экспрессия которого, очевидно, необходима для развития 2X:2A особей в самок. Для обоих полов наблюдалось достоверное снижение экспрессии целевого гена. Нужно отметить, что через трое суток после воздействия на личинок дрозофилы антисмысловым oligoRING-фрагментом достоверное снижение экспрессии целевого DIAP-2-гена ещё отсутствовала в куколках дрозофилы (Таблица 5.3).

Таблица 5.3 – Относительное снижение (в количество раз) экспрессии антиапоптозного DIAP-2-гена в куколках дрозофилы под влиянием ДНК-олигонуклеотидов

	контроль	oligoRING-2(+)	oligoRING-2(-)
куколочки	1	3,37±2,81	6,07± 4,71

Примечание: экспрессия DIAP-2-гена в контрольных группах (вода) взята за 1 (100%); в каждой группе было проанализировано по 6 куколок

Таким образом, на клетках личинок непарного шелкопряда и дрозофилы была показана возможность снижения экспрессии целевого антиапоптозного гена путём контактного использования короткого (18 нуклеотидов длиной) антисмыслового фрагмента целевого антиапоптозного гена. В обоих случаях применение антисмысловых фрагментов их антиапоптозных IAP-Z-гена и DIAP-2-гена приводило к достоверно частому формированию самцов, что, очевидно, указывает на связь DIAP-2-гена со сплайсингом гена-"переключателя" sex-lethal, ответственного за возникновение пола у дрозофилы (Salz, 2010).

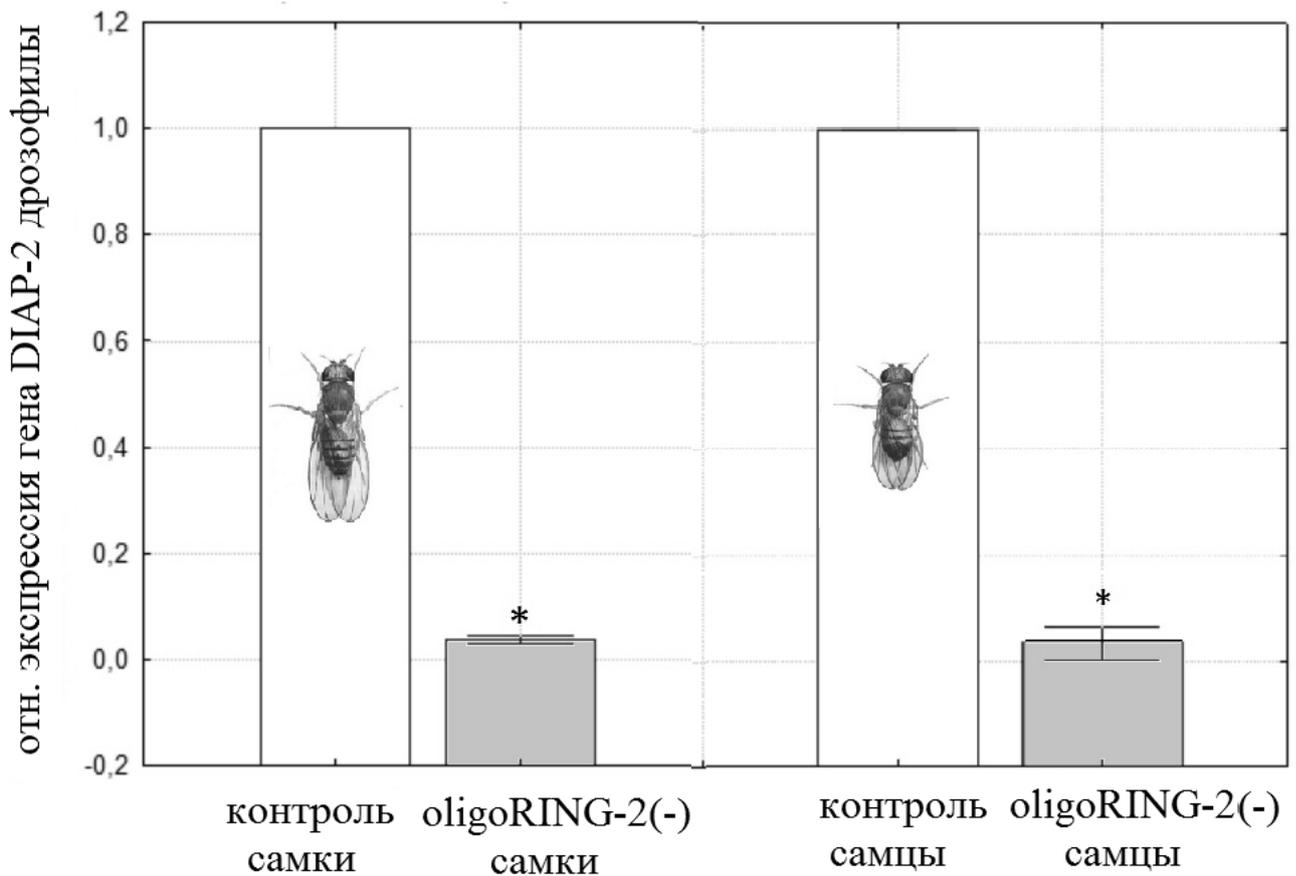


Рисунок 5.11 – Относительная экспрессия антиапоптозного DIAP-2-гена в имаго (самки и самцы) *D. melanogaster*, которые были обработаны oligoRING-2(-)-олигонуклеотидом на стадии личинки. В каждой группе было проанализировано по 6 особей. Экспрессия DIAP-2-гена в контрольных группах (вода) взята за 1 (100%). Снижение экспрессии DIAP-2-гена насекомого в группе "oligoRING-2(-)" против контроля обозначено \* при  $p < 0,01$

#### 5.1.4 Анализ микросрезов гусениц непарного шелкопряда, контактно обработанных ДНК-олигонуклеотидами

При анализе микросрезов тканей безвирусных гусениц непарного шелкопряда I возраста также были обнаружены апоптотические процессы в клетках насекомого на 14-е сутки после обработки oligoRING-фрагментом в концентрации 3 пмоль/гусеницу (Рисунок 5.12, Б). Наибольшие разрушения

тканей под действием oligoRING-фрагмента были обнаружены в покровной ткани и клетках эпителия кишечника с признаками апоптоза (уменьшение объёма клеток, конденсация и фрагментация хроматина). Кроме этого, в качестве контрольных олигонуклеотидов были применены oligoA-фрагмент (5'-AAA AAA AAA AAA AAA-3') и oligoHB-фрагмент (5'-GCT GCA CCA CCG TGC CGC-3') в концентрации 3 пмоль/гусеницу. OligoHB-фрагмент является частично комплементарным мРНК антиапоптозного IAP-Z-гена (11 из 18 нт совпадают с фрагментом целевого сайта РНК-мишени) и его применение может объяснить влияние на клетки oligoBIR-фрагмента (10 из 18 нт совпадают с фрагментом целевого сайта РНК-мишени) (Рисунок 5.10), оказавшему влияние на экспрессию IAP-1-гена и CASP-4-гена в яйцах насекомого (Рисунок 5.8 и Рисунок 5.9). Такие данные расширяют понимание действия ДНК-фрагментов, которые не обладают совершенной комплементарной поверхностью к мРНК целевого гена и помогут оценить риски их неизбирательного воздействия на нецелевые организмы.

У насекомых контрольной группы не было обнаружено существенных отклонений. Покровы гусениц были в пределах нормы (Рисунок 5.12, А). Кутикула отсутствовала в связи с использованием формалина в качестве консерванта ткани. Покровы волосистые. Кожа представлена кубическими эпителиальными клетками. Под кожей почти полностью на всем ее протяжении прикреплены мышцы, начиная от тонкого слоя и заканчивая несколькими слоями, в зависимости от части тела гусеницы. Кроме того, в покровах присутствует большое количество пигментных клеток, особенно в головном сегменте, имеющих однородную структуру и базофильную окраску.

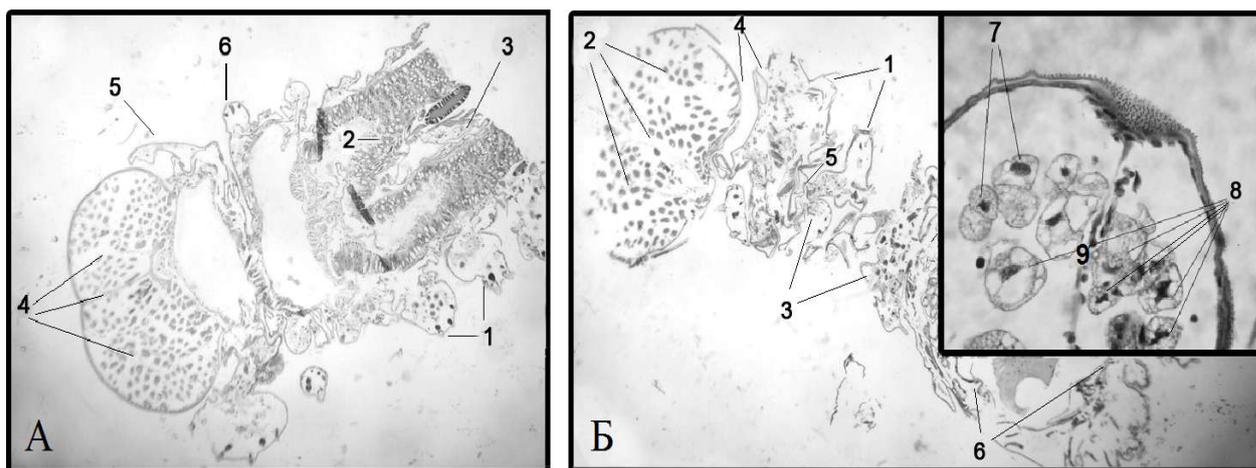


Рисунок 5.12 – Световая микроскопия гистологических микросрезов гусениц непарного шелкопряда (увеличение  $\times 40$  для фото А,Б и  $\times 80$  для верхнего правого фрагмента фото Б); А (контроль, обработанный водой): 1 – внешние покровы, 2 – железистые клетки, 3 – пищевод, 4 – пигментные клетки 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 вакуолизирующаяся клетка. Микросрезы толщиной около 4 мкм были выполнены на микротоме "Ротмик-1" (Россия). Препараты были окрашены гематоксилином и эозином (БиоВитрум, Россия). Эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 20-30 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

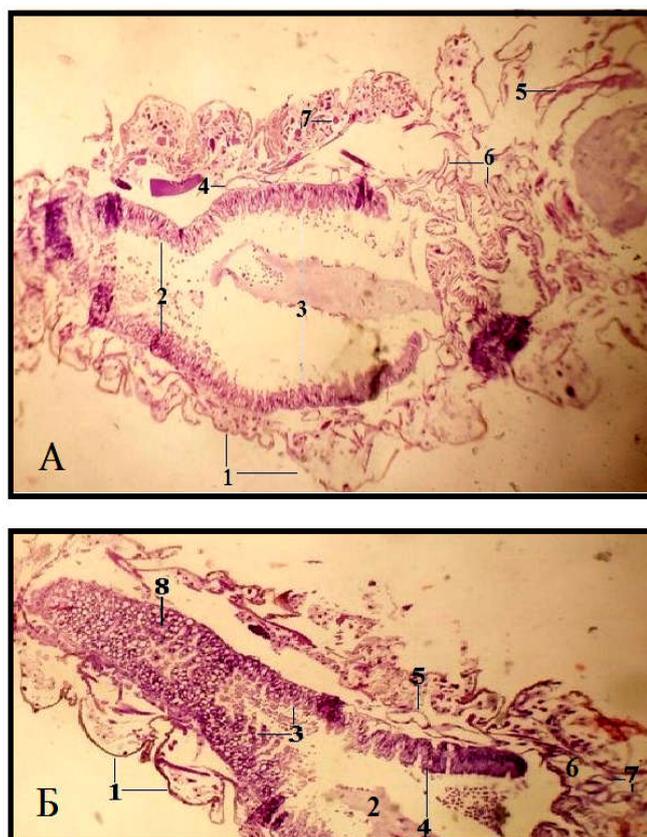


Рисунок 5.13 – Световая микроскопия гистологических микросрезов гусениц непарного шелкопряда (увеличение  $\times 40$  для фото А,Б); А (обработанная oligoА-фрагментом гусеница, не демонстрирующая серьёзных изменений): 1 – внешние покровы, 2 – эпителий тонкого кишечника, 3 – эпителий толстого кишечника, 4 – сердце, 5 – анальная часть пищеварительной трубки, 6 – мальпигиевы сосуды 7 – пигментные клетки; Б (обработанная oligoНВ-фрагментом гусеница, демонстрирующая выраженную пролиферацию клеток пищевода): 1 – внешние покровы, 2 – фрагмент тканей; 3 – эпителий тонкого кишечника, 4 – эпителий толстого кишечника, 5 – сердце, 6 – признаки склероза; 7 – мальпигиевы сосуды, 8 – пролиферация эпителиальных клеток пищевода. Микросрезы толщиной около 4 мкм были выполнены на микротоме "Ротмик-1" (Россия). Гусеницы были фиксированы в 10%-ном растворе формалина и затем были проведены по стандартной методике с последующей заливкой в парафин. Препараты были окрашены гематоксилином и эозином (БиоВитрум, Россия). Эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 20-30 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

Напротив, в наружных покровах гусениц из экспериментальных групп наблюдаются четко выраженные отклонения от нормы. Наименьшие изменения представлены в группе "oligoA" (Рисунок 5.13, А). Покровы гусениц этой группы претерпели следующие изменения: утолщение кожи и повреждение некоторых участков внешних покровов. Утолщение возникло вследствие увеличения размера эпителиальных клеток, а также за счет увеличения мышечных волокон. Это может быть вызвано отёком цитоплазмы или усилением синтетических процессов внутри клетки. Также стоит добавить, что эпителиальные клетки в контрольной группе примыкают друг к другу плотно, через десмосомы и полудесмосомы, в то время как в группе "oligoA" клетки разрежены, указывая на то, что клеточные контакты были повреждены.

Наиболее выраженные изменения присутствуют в экспериментальной группе "oligoRING". Внешние покровы гусениц из этой группы либо уничтожены в результате апоптоза, либо сильно истончились. Количество эпителиальных клеток сильно уменьшилось в результате апоптотического воздействия oligoRING-фрагмента. Сами эпителиальные клетки находятся в разрушенном состоянии. В некоторых случаях можно выделить процессы разрушения клеточного ядра. Кроме того, в группе "oligoRING" произошло уменьшение количества пигментных клеток практически во всех сегментах, не считая головы, где пигментные клетки не затронуты, но их перегородка истончилась. Также были утрачены клетки эпителия, а сама перегородка была представлена тонким слоем кутикулы.

Интересные изменения произошли в экспериментальной группе "oligoHB" (Рисунок 5.13, Б). В то время как в других экспериментальных группах наблюдалась тенденция к сокращению числа эпителиальных клеток покровов, здесь обнаружена противоположная тенденция. В этой группе не только сохранилось количество клеток, но и произошёл их прирост. При этом толщина внешнего слоя растет не за счет увеличения количества эпителиальных клеток, но за счет склеротизации этих покровов. Было обнаружено несколько массивных слоев соединительной ткани под слоем эпителиальных клеток. Но стоит отметить,

что, несмотря на "сохраняющий жизнь эффект" oligoНВ-фрагмента, происходит увеличение количества соединительной ткани и в то же время есть случаи гибели клеток. Полученные результаты указывают на спорное воздействие данного фрагмента. В целом, тенденция была направлена на увеличение числа клеток.

Микроскопическая структура гусениц контрольной группы была в норме. Кровеносная система представлена сосудом – "сердцем". "Сердце" представлено тонким слоем плоского эпителия (эндотелиальный слой) и средней оболочки, содержащей тонкий слой мышечных клеток, необходимых для конструкции стенки сосуда и циркуляции гемолимфы. Кроме того, есть очень тонкая адвентиция, которая видна только в группе "oligoНВ". Выделительная система состоит из мальпигиевых сосудов – тонких трубчатых кишечных наростов. Их свободные концы находятся в полости тела. Стенки сосудов состоят из однослойного эпителия. Клетки разрежены и снаружи покрыты эпителиальной базальной мембраной. Сосуды также имеют свои собственные мышцы. Поверхность клеток, направленная в просвет, имеет тонкие плазматические отростки. Пищеварительная система представлена ротовым отверстием, пищеводом, кишечной трубкой, а также анальным отверстием. Ротовая полость представлена верхней парой (мандибулы) и нижней парой (максиллы) челюстей. Мандибулы хорошо развиты и представляют собой сильно склеротизированное образование. Максиллы не такие развитые, под их нижним краем имеются видоизмененные слюнные железы (шелкопрядильные). Пищевод представлен слизистой и мышечной оболочками. Слизистая оболочка представлена плотно расположенными однослойными кубическими эпителиоцитами. Мышечная оболочка содержит тонкий слой миоцитов. В пищеварительной трубке можно выделить тонкую и толстую кишки, их слизистую и мышечную оболочки. Слизистая оболочка в тонкой кишке представлена крупными эпителиальными клетками и по мере продвижения по этой трубке клетки увеличиваются. Ядра лежат на базальном полюсе клетки. Имеется небольшое число базофильно окрашенных секреторных гранул, расположенных в крипах (группах мелких клеток). Помимо гранул в крипах находятся незрелые клетки. Зрелые

эпителиоциты вытягиваются, образуя выпячивания. Клетки плотно прилегают друг к другу. Мышечная оболочка представлена одним слоем продольно расположенных клеток. В толстой части кишки эпителиоциты крупнее, чем в тонкой, секреторных гранул больше, число крипт уменьшается, но они становятся более крупными. Ядра лежат на базальном полюсе клетки. Эпителиоциты лежат равномерно, выпячиваний не образуют. Анальное отверстие содержит очень плотную мышечную оболочку, которую прободают мальпигиевы сосуды.

Изменения в экспериментальной группе "oligoA" не были существенными. Они коснулись покровов и мальпигиевых сосудов. Наиболее значительные видоизменения были обнаружены в пищеварительной системе. В мальпигиевых сосудах наблюдалась склеротизация из-за недостатка питательных веществ. В результате склеротизации сосуды находятся в состоянии близком к некротическому и эпителиальные клетки практически отсутствуют. Изменена форма сосудов. В норме сосуды вытянуты, но в этом случае они сплющены. Также присутствовали некоторые слипшиеся мальпигиевы сосуды. В пищеварительной системе был отмечен рост слизистой оболочки пищевода. В дополнение к этому начальная часть эпителиальных клеток пищевой трубки претерпела изменения и потеряла свои секреторные гранулы. Крипты практически отсутствовали, преобладали мелкие, незрелые клетки. В других частях пищеварительной трубки произошло разрушение клеток. Анальная часть трубки претерпела незначительные изменения, из-за которых был отёк эпителиальных клеток.

Изменения в группе "oligoRING" оказались наиболее показательными. Там произошли изменения во всех структурах. Изменения наружных покровов были описаны выше. "Сердце" очень сильно истончилось, мышечные клетки практически отсутствовали, а те, что остались, претерпели атрофию. Эпителиальные клетки также подверглись атрофии. Они уменьшились в размере и потеряли контакт друг с другом. Число выделительных органов увеличилось, но при этом изменились и сами мальпигиевы сосуды. Они уменьшились в размерах, количество эпителиальных клеток снизилось, но они не находились в

некротическом состоянии, как другие структуры. Встречались слившиеся мальпигиевы сосуды и единичные атрофированные мальпигиевы сосуды. Также встречались одиночные сосуды с признаками апоптоза. В целом, количество мальпигиевых сосудов возросло, что может быть компенсаторной реакцией на массовый апоптоз. Возможно, что таким образом тело насекомого стремилось удалить лишнюю жидкость или токсины. Пищеварительная система гусениц из группы "oligoRING" практически полностью была уничтожена за исключением анальной части пищеварительного тракта. Размеры мандибул заметно уменьшились за счет гибели соединительной ткани. Эпителиальные клетки слизистой оболочки пищевода чрезвычайно сильно были уменьшены в размерах, а также имели признаки апоптоза. Мышечная оболочка пищевода полностью отсутствовала. Слизистая оболочка пищеварительного тракта была разрушена в результате апоптоза. Встречались отдельные кластеры эпителиальных клеток разного возраста. Секреторные гранулы практически не были видны. Разграничение между эпителиальными клетками исчезли. Крипты отсутствовали. В анальной части толстой кишки апоптотические клетки были менее распространены. Имелись мертвые клетки в местах разрыва стенок заднего прохода. Массивная мышечная оболочка заметно уменьшилась в размерах из-за атрофии мышц. Слизистые эпителиальные клетки уменьшились в размерах, а также присутствовала десквамация эпителия. В целом, в гусеницах из группы "oligoRING" наблюдались летальные изменения во всех типах тканей. Наибольшие изменения были представлены в пищеварительной системе, а также в наружных покровах. Меньше всего изменений было в мальпигиевых сосудах и пигментных клетках, которые не были затронуты, хотя их секреторная активность снизилась.

Достаточно значительные изменения были обнаружены в группе "oligoHB". Если в группе "oligoRING" тенденция была к сокращению числа клеток, что в итоге приводило к последующей гибели организма, то в группе "oligoHB" всё было наоборот. В целом, в этой группе есть противоречия. С одной стороны, происходит увеличение числа клеток, что приводит к утолщению тканей. При

этом следует отметить, что гусеницы группы "oligoHB" имели тенденцию к набору веса, но с другой стороны, присутствует значительная гибель клеток и их последующее замещение соединительной тканью. По всем этим показателям можно сказать, что для группы "oligoHB" характерен компенсаторный эффект, проявившийся как увеличением мышечных волокон, так и увеличением численности соединительной ткани. Кроме того, эпителиальные клетки "сердца" уменьшились в размере, а также можно встретить мертвые эпителиоциты. Мальпигиевы сосуды также были гипертрофированы. Они увеличились за счет разрастания соединительной ткани. Эпителиальные клетки не были изменены. Встречались одиночные сосуды, которые были уничтожены. Также можно было встретить одиночные и полностью склеротизированные мальпигиевы сосуды.

Как и в группе "oligoRING", наиболее сильные изменения в группе "oligoHB" произошли в пищеварительной системе. И следует отметить тот факт, что вдоль пищеварительного тракта эти изменения проявлялись по-разному. В одной части можно было встретить разрушение пищеварительной трубки и её замену соединительной тканью, в то время как в другой части наблюдалась выраженная пролиферация эпителиальных клеток пищеварительного тракта. Кроме того, число клеток увеличилось достаточно сильно. Можно найти делящиеся клетки. Также можно встретить отдельные клетки, претерпевающие апоптоз. В одной из частей слизистой оболочки пищевода эпителиальные клетки пролиферировали настолько сильно, что практически закрыли само отверстие пищевода, в то время как в другой его части эпителиальные клетки разрушились. Примерно такая же картина представлена и в пищеварительной трубке. Выросло число незрелых клеток, уменьшилось число зрелых клеток, деградировали секреторные гранулы, что привело к накоплению белковых включений в полости трубки. Анальная часть кишечника подверглась склеротизации.

Таким образом, у гусениц в контрольной группе не наблюдалось существенных изменений в тканях. Все 3 экспериментальные группы показали различные изменения в микроскопической структуре гусениц. В группе "oligoA" гусеницы показали незначительные изменения. Наиболее выраженные изменения

были в группе "oligoRING". Там была активная гибель клеток, деградация тканей, а также значительные структурные деформации, вызванные апоптозом. В целом, изменения, наблюдаемые в гусеницах группы "oligoRING", оказались смертельными, так как все основные структуры, необходимые для обеспечения нормальной жизнедеятельности, были сильно изменены или уничтожены. Результаты по влиянию oligoRING-фрагмента на шелкопряда согласуются с данными, полученными в 3-м разделе работы. Гусеницы из группы "oligoHB" показали противоречивые результаты. С одной стороны, была гибель клеток, с другой стороны – их активная пролиферация, направленная на сохранение жизни организма. Несмотря на активное деление эпителиальных клеток, эпителий преимущественно был заменён соединительной тканью. На макроскопическом уровне гусеницы из группы "oligoHB" снизили вес на 18,4% по сравнению с контролем ( $4,85 \pm 0,79$  мг против  $5,94 \pm 0,14$  мг соответственно).

Противоположный эффект – увеличение биомассы насекомого – был обнаружен в группе "oligoHB" с заражёнными ВЯП НШ гусеницами на 14-е сутки эксперимента,  $3,71 \pm 0,39$  мг в заражённой ВЯП НШ группе "oligoHB" против  $2,38 \pm 0,1$  мг в группе заражённого ВЯП НШ контроля ( $p < 0,05$ ). Увеличение биомассы гусениц сопровождалось увеличением их жизнеспособности. На 14-е сутки в группе "oligoHB" погибло  $50,1 \pm 3,9$  % гусениц против  $63,3 \pm 10,1$  % в контроле. Данная интересная находка позволяет сделать предположение, что oligoHB-фрагмент противостоит вирусной инфекции, по-видимому, за счёт стимуляции пролиферации клеток. Рассмотренный эффект интересен для более детального изучения, так как может иметь практический выход в медицине для лечения вирусных заболеваний. Было также показано, что oligoHB-фрагмент достоверно снижает экспрессию антиапоптозного IAP-1-гена заражённого ВЯП НШ непарного шелкопряда (Рисунок 5.14), однако не приводит его к гибели. Нужно отметить, что на данный момент геном непарного шелкопряда не секвенирован полностью, поэтому судьба oligoHB-фрагмента в клетках шелкопряда может быть очень разнообразной: от несовершенного спаривания с мРНК IAP-Z-гена до совершенного спаривания с мРНК какого-либо другого гена.

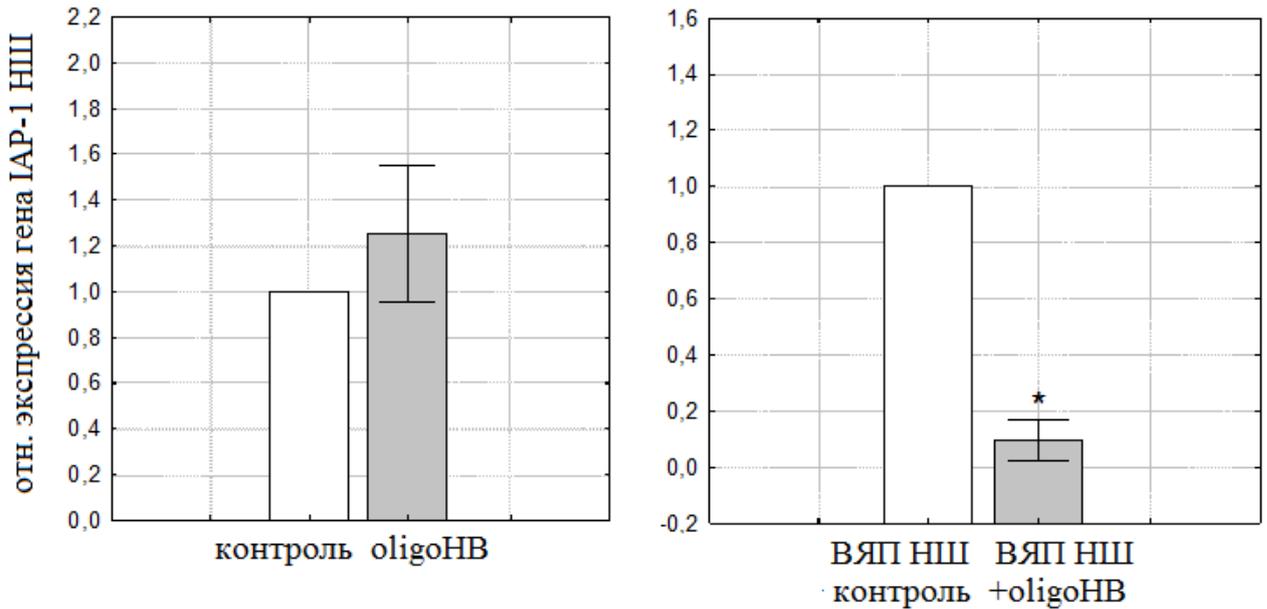


Рисунок 5.14 – Относительная экспрессия антиапоптозного IAP-1-гена в безвирусных и заражённых ВЯП НШ гусеницах непарного шелкопряда на 14-е сутки после обработки oligoNB-фрагментом (3 пмоль/гусеницу). В каждой группе было проанализировано по 6 особей. Экспрессия IAP-1-гена в контрольных группах (вода) взята за 1 (100%). Снижение экспрессии IAP-1-гена в заражённых ВЯП НШ насекомых из группы "oligoNB" против заражённого контроля обозначено \* при  $p < 0,01$ . гена насекомого в группе "oligoRING" против контроля обозначено \* при  $p < 0,05$ . Гусениц заразили согласно методике, описанной для экспериментов с насекомым в подразделе 4.1 (Рисунок 4.3), используя препарат "Пинквир" (Россия). Эффективность заражения гусениц ВЯП НШ была показана методом ПЦР со специфическими праймерами к гену капсида р39 ВЯП НШ (подраздел 2.7) и составила 50% на 5-е сутки после окончания 2-дневного периода заражения. Смертность в безвирусном контроле на 14-е сутки составила 7,9%.

Были использованы гусеницы из одной яйцекладки

Таким образом, снижение экспрессии целевого антиапоптозного 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 согласуются с данными о снижении биомассы и увеличения смертности безвирусных насекомых, полученными в 3-м разделе работы. В группе "oligoA" гусеницы показали незначительные изменения (в основном в пищеварительной системе) по сравнению с oligoRING-фрагментом. OligoHB-фрагмент, который является частично комплементарным мРНК антиапоптозного IAP-Z-гена (11 из 18 нт совпадают с фрагментом целевого сайта РНК-мишени) (Рисунок 5.10), не выявил значительного инсектицидного эффекта, а на заражённых ВЯП НШ гусеницах даже проявил тенденцию к увеличению биомассы и выживаемости насекомого. На безвирусных насекомых снижение экспрессии целевого IAP-Z-гена (Рисунок 5.7), а также IAP-1-гена шелкопряда под действием oligoHB-фрагмента на 14-е сутки не было обнаружено (Рисунок 5.14). Гистологические исследования с oligoHB-фрагментом и oligoA-фрагментом показали интересные эффекты в тканях насекомого, расширяя понимание действия oligoRING-фрагмента и других антисмысловых олигонуклеотидов на клетки непарного шелкопряда.

## **5.2 Заражённые ВЯП НШ гусеницы непарного шелкопряда**

### **5.2.1 Снижение экспрессии антиапоптозных генов системы взаимоотношений вирус-хозяин под действием oligoRING-фрагмента антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ**

В подразделе 5.1.3 было показано, что фрагмент хозяйского антиапоптозного IAP-Z-гена обладает очень высокой степенью схожести (>90%) с фрагментом IAP-3-гена ВЯП НШ. В случае заражения бакуловирусом в клетках шелкопряда будут присутствовать мРНК обоих целевых генов, которые имеют

комплементарные oligoRING-фрагменту участки. OligoRING-фрагмент при помощи РНКазы Н будет инактивировать как антиапоптозный IAP-3-ген вируса, так и хозяйский IAP-Z-ген, вызывая апоптоз в клетках шелкопряда. Нужно отметить, что бакуловирусы в ответ на инфекцию сдерживают апоптотические процессы в клетках благодаря антиапоптозным белкам (IAP-белки и P35-белки), которые являются более устойчивыми, чем антиапоптозные белки хозяина (Vandergaast et al., 2015). Из этого следует, что в зараженных клетках насекомых будет протекать 2 разнонаправленных процесса: экспрессия IAP-3-гена ВЯП НШ будет повышаться, а экспрессия хозяйского IAP-Z-гена – будет понижаться.

Для эксперимента были взяты заражённые ВЯП НШ гусеницы шелкопряда (Рисунок 4.3). В группе "oligoRING" было обнаружено достоверное снижение экспрессии антиапоптозного IAP-1-гена шелкопряда в 30,7 раз по сравнению с контролем на 14-е сутки эксперимента (Рисунок 5.15). Снижение экспрессии IAP-1-гена согласуется с полученными ранее данными о том, что oligoRING-фрагмент вызывает снижение жизнеспособности и уменьшение биомассы заражённых ВЯП НШ насекомых, запуская выраженные апоптотические процессы в заражённых клетках по механизму действия антисмысловых олигонуклеотидов (раздел 4). Нужно отметить, что в одинаковых условиях несовершенный антисмысловый oligoNB-фрагмент снизил экспрессию IAP-1-гена только в 10,3 раза (Рисунок 5.14), т.е. в 2,98 раза слабее, чем oligoRING-фрагмент.

Таким образом, совершенный антисмысловый oligoRING-фрагмент всегда проявляет более выраженный инсектицидный эффект по сравнению с несовершенными антисмысловыми олигонуклеотидами (oligoBIR-фрагментом и oligoNB-фрагментом). Очень перспективно с практической точки зрения для сельского и лесного хозяйств выглядит возможность ускорения гибели заражённого ВЯП НШ насекомого за счёт прерывания относительно медленного размножения бакуловируса, используя короткий oligoRING-фрагмент в качестве триггера (oligoRING-фрагмент составляет около 0,006% полного генома ВЯП НШ).

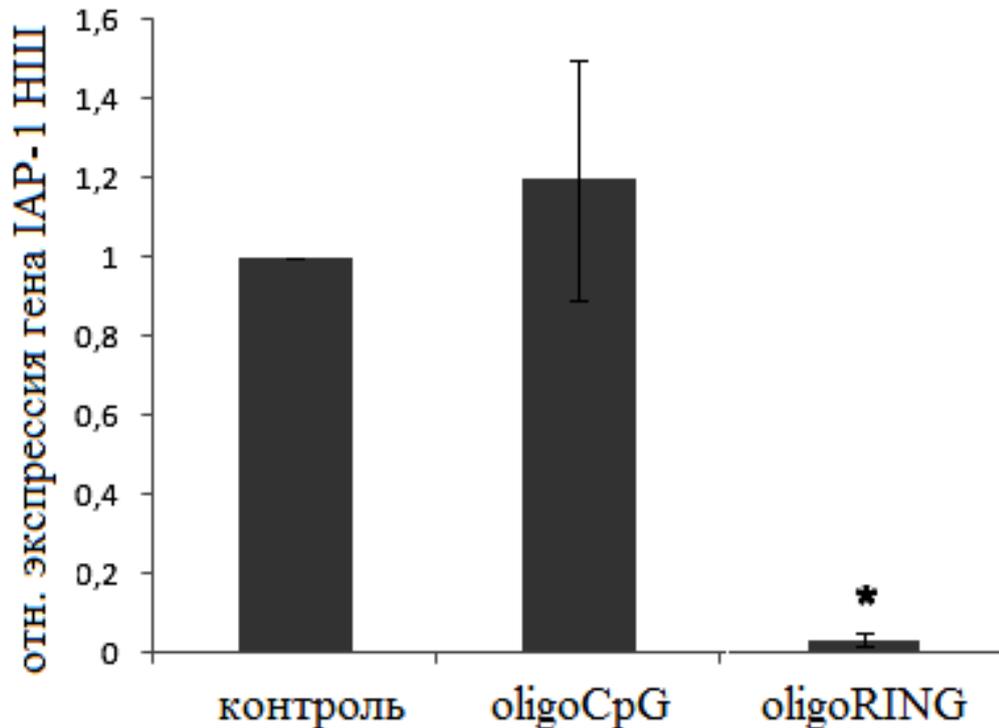


Рисунок 5.15 – Относительная экспрессия антиапоптозного IAP-1-гена у заражённых в лаборатории ВЯП НШ гусениц непарного шелкопряда на 14-е сутки после обработки водой и олигонуклеотидами (oligoRING-фрагментом и oligoCpG-фрагментом) в концентрации 3 пмоль/гусеницу. В каждой группе было проанализировано по 6 особей. Экспрессия IAP-1-гена в контрольных группах (вода) взята за 1 (100%). Снижение экспрессии IAP-1-гена насекомого в группе "oligoRING" против контроля обозначено \* при  $p < 0,001$ . Гусениц заразили согласно методике, описанной для экспериментов с насекомым в подразделе 4.1 (Рисунок 4.3), используя препарат "Пинквир" (Россия). Эффективность заражения гусениц ВЯП НШ была показана методом ПЦР со специфическими праймерами к гену капсида р39 ВЯП НШ (подраздел 2.7) и составила 50% на 5-е сутки после окончания 2-дневного периода заражения. Смертность в безвирусном контроле на 14-е сутки составила 7,9%. Были использованы гусеницы из одной яйцекладки

У заражённых ВЯП НШ гусениц была проанализирована суммарная экспрессия IAP-Z-гена непарного шелкопряда и IAP-3-гена ВЯП НШ. Изучить экспрессию данных генов по отдельности на фоне бакуловирусной инфекции практически очень сложно, так как они обладают большой гомологией. IAP-Z-праймер (5'-AGG CCC GTG TCG CCG GTC-3') и oligoRING-праймер во время ОТ-ПЦР РВ детектируют кДНК, которая была получена как на основе мРНК IAP-3-гена ВЯП НШ, так и на основе мРНК хозяйского IAP-Z-гена. В целом, такой анализ помогает понять вектор развития ситуации в клетке. Если суммарная экспрессия генов повышена, то биохимия клеток направлена в сторону выживания, если понижена – в сторону гибели. Во всех группах эксперимента отсутствовало достоверное повышение либо понижение экспрессии IAP-Z-гена по отношению к контролю (Рисунок 5.16). Экспрессия антиапоптозного IAP-Z-гена шелкопряда была в среднем в  $1,38 \pm 0,6$ ,  $1,2 \pm 0,4$  и  $3,08 \pm 0,9$  раза выше в группах "oligoCpG", "oligoHB" и "oligoRING" соответственно, чем в контроле. Полученный результат оказался до определённой степени неожиданным, так как на этих же гусеницах было получено достоверное снижение экспрессии IAP-1-гена хозяина в группах "oligoHB" и "oligoRING". Так как анализ был проведён на 14-е сутки, когда в группах эксперимента остались только сильные гусеницы, преодолевшие вирусную инфекцию, то, по-видимому, хозяйский антиапоптозный IAP-Z-ген одним из первых повысил свою экспрессию в клетках насекомого из всех экспериментальных групп, ознаменовав "решение" клеток не погибать. Наиболее выраженной данная тенденция – повышение экспрессии IAP-Z-гена – была в группе "oligoRING", где смертность гусениц была наиболее высокой и, очевидно, остались самые стойкие особи. ПЦР со специфическими праймерами (подраздел 2.7) не выявила маркеров вирусной ДНК в гусеницах непарного шелкопряда, выживших в группе "oligoRING" на 14-е сутки эксперимента. Тем не менее, в клетках в определённый момент времени под действием oligoRING-фрагмента должно происходить суммарное снижение экспрессии целевых IAP-Z-гена шелкопряда и IAP-3-гена ВЯП НШ по сравнению с контролем, и, как следствие, апоптотические процессы в клетках должны протекать интенсивнее.

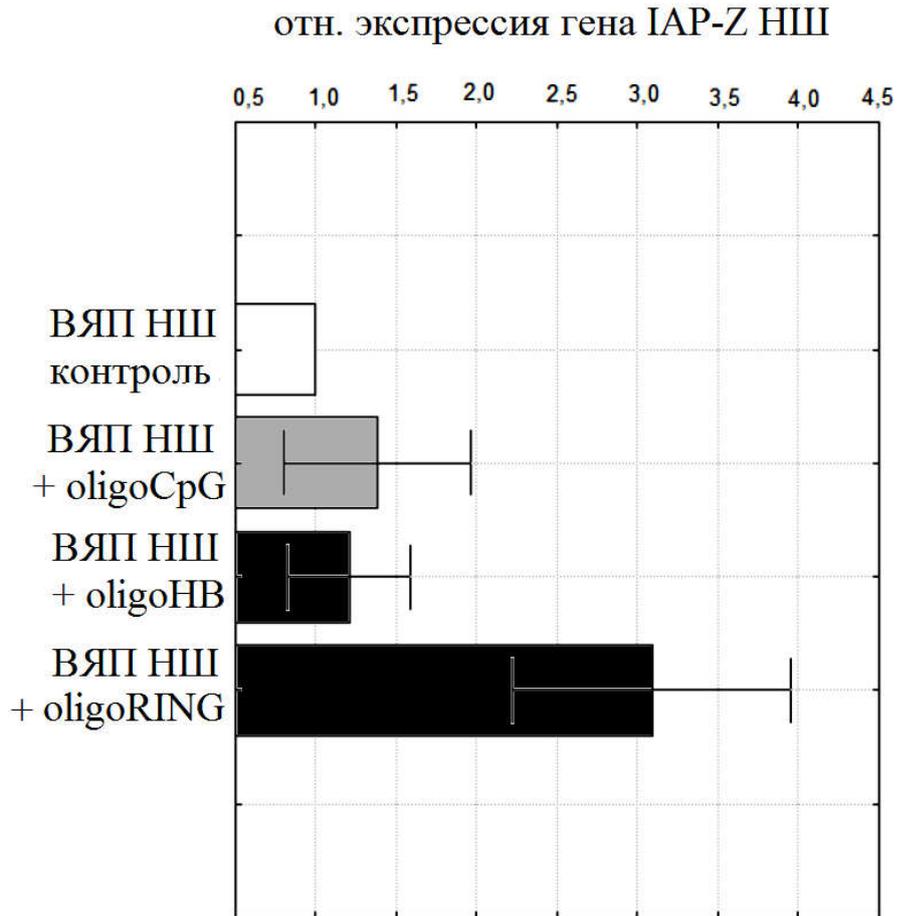


Рисунок 5.16 – Относительная суммарная экспрессия антиапоптозного IAP-Z-гена шелкопряда и IAP-3-гена бакуловируса у заражённых в лаборатории ВЯП НШ гусениц непарного шелкопряда на 14-е сутки после обработки водой и одноцепочечными олигонуклеотидами: oligoRING-фрагментом, oligoCpG-фрагментом и oligoHB-фрагментом (3 пмоль/гусеницу). В каждой группе было проанализировано по 6 особей. Суммарная экспрессия IAP-Z-гена и IAP-3-гена в контрольных группах (вода) взята за 1 (100%). Гусениц заразили согласно методике, описанной для экспериментов с насекомым в подразделе 4.1 (Рисунок 4.3), используя препарат "Пинквир" (Россия). Эффективность заражения гусениц ВЯП НШ была показана методом ПЦР со специфическими праймерами к гену капсида р39 ВЯП НШ (подраздел 2.7) и составила 50% на 5-е сутки после окончания 2-дневного периода заражения. Смертность в безвирусном контроле на 14-е сутки составила 7,9%. Были использованы гусеницы из одной яйцекладки

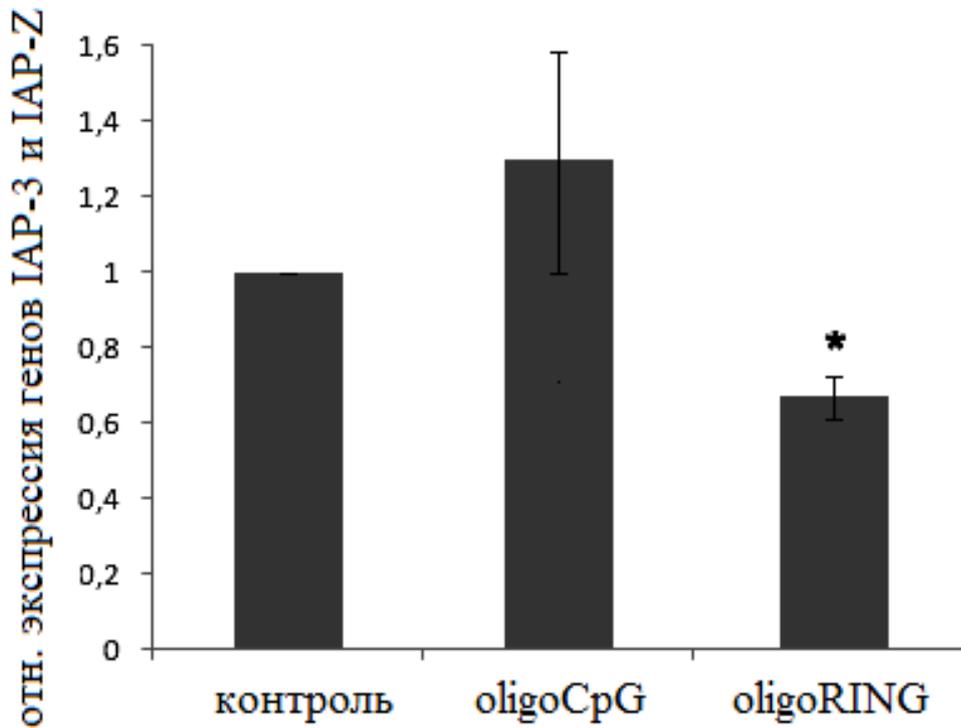


Рисунок 5.17 – Относительная суммарная экспрессия антиапоптозного IAP-Z-гена шелкопряда и IAP-3-гена бакуловируса у заражённых в лаборатории ВЯП НШ гусениц непарного шелкопряда на 5-е сутки после обработки водой и олигонуклеотидами (oligoRING-фрагментом и oligoCpG-фрагментом) в концентрации 3 пмоль/гусеницу. В каждой группе было проанализировано по 6 особей. Суммарная экспрессия IAP-Z-гена и IAP-3-гена в контрольных группах (вода) взята за 1 (100%). Суммарное снижение экспрессии IAP-Z-гена и IAP-3-гена насекомого в группе "oligoRING" против контроля обозначено \* при  $p < 0,05$ . Гусениц заразили согласно методике, описанной для экспериментов с насекомым в подразделе 4.1 (Рисунок 4.3), используя препарат "Пинквир" (Россия). Эффективность заражения гусениц ВЯП НШ была показана методом ПЦР со специфическими праймерами к гену капсида р39 ВЯП НШ (подраздел 2.7) и составила 50% на 5-е сутки после окончания 2-дневного периода заражения

Было решено проанализировать пик смертности гусениц. В группе "oligoRING" на 5-е сутки исследования (начало пика смертности, Рисунок 4.3) было обнаружено достоверное снижение на  $36,6 \pm 7,1\%$  суммарной экспрессии хозяйского IAP-Z-гена и бакуловирусного IAP-3-гена по сравнению с контролем (Рисунок 5.17). 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 непарного шелкопряда.

Также установлено, что присутствие ВЯП НШ в организме насекомого в течение 5 суток повышает суммарную экспрессию IAP-3 гена и IAP-Z-гена в  $1,52 \pm 0,18$  раза по сравнению с безвирусным контролем ( $n=6$ ;  $p < 0,05$ ), что увеличивает концентрацию целевых мРНК для комплементарного взаимодействия с oligoRING-фрагментом и объясняет успешность его применения. Таким образом, на заражённых ВЯП НШ гусеницах непарного шелкопряда было продемонстрировано суммарное снижение экспрессии IAP-3-гена вируса и хозяйского IAP-Z-гена, что указывает на специфичность возникающих биологических эффектов в ответ на oligoRING-фрагмент.

Для дополнительного подтверждения запуска более интенсивных по сравнению с контролем апоптотических процессов в заражённых клетках шелкопряда под действием oligoRING-фрагмента, применили метод детекции апоптотической "ДНК-лестницы".

### **5.2.2 Детекция апоптотической "ДНК-лестницы" в заражённых ВЯП НШ гусеницах непарного шелкопряда, обработанных одноцепочечными ДНК-фрагментами**

Исследования показывают, что бакуловирусы при помощи своих антиапоптозных белков эффективно сдерживают развитие апоптоза в заражённых клетках насекомых, что даёт им возможность получить доступ к ресурсам клетки.

В то же время они кодируют белковые факторы, которые вызывает апоптоз в инфицированных клетках и способствует выходу зрелого вируса из клетки (Clem, 2001). С другой стороны, сами заражённые клетки запускают апоптоз, чтобы обезопасить здоровые клетки и уничтожить вирус. Решение о том, будут инфицированные бакуловирусом клетки претерпевать апоптоз или нет, опирается на сложные взаимосвязи между функциями белков системы апоптоза-антиапоптоза клеток хозяина и вируса, которые участвуют в индукции и подавлении апоптоза (Ishikawa et al., 2003).

Методом детекции специфической "ДНК-лестницы" была изучена степень апоптотических процессов в погибших заражённых ВЯП НШ гусеницах из разных групп эксперимента (Рисунок 5.18). Апоптотическая "ДНК-лестница" характеризуется разрезанием клеточной ДНК на фрагменты, кратные 180-200 п.н., что является одной из причин гибели клетки в ответ на различные факторы среды, включая вирусную инфекцию (Matassov et al., 2004).

Было использовано 5 яйцекладок, которые были рандомизированы и вышедшие из яиц шелкопряда гусеницы были использованы для экспериментов. Смертность в безвирусном контроле на 7-е сутки составила 14,8%. Перед обработкой ДНК-олигонуклеотидами (3 пмоль на гусеницу) насекомых содержали в течение 2-х суток на питательной среде, содержащей  $2 \times 10^3$  вирусных полиэдров препарата "Пинквир" (Россия) на 1 мг среды, а после заражения – на безвирусной среде. Зараженность гусениц ВЯП НШ была показана методом ПЦР со специфическими праймерами к гену капсида р39 ВЯП НШ и составила 40% на 5-е сутки после заражения. Апоптоз был обнаружен в погибших гусеницах из всех групп эксперимента (Clarke, 2003), но степень его проявления варьировала. 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. Нуклеазы полностью разрушили высшую фракцию (ВФ) ДНК, а также верхние фракции апоптотической "ДНК-лестницы", сформировав единую фракцию длиной около 100-180 п.н. в нижней части электрофореграммы (Ванюшин, 2001).

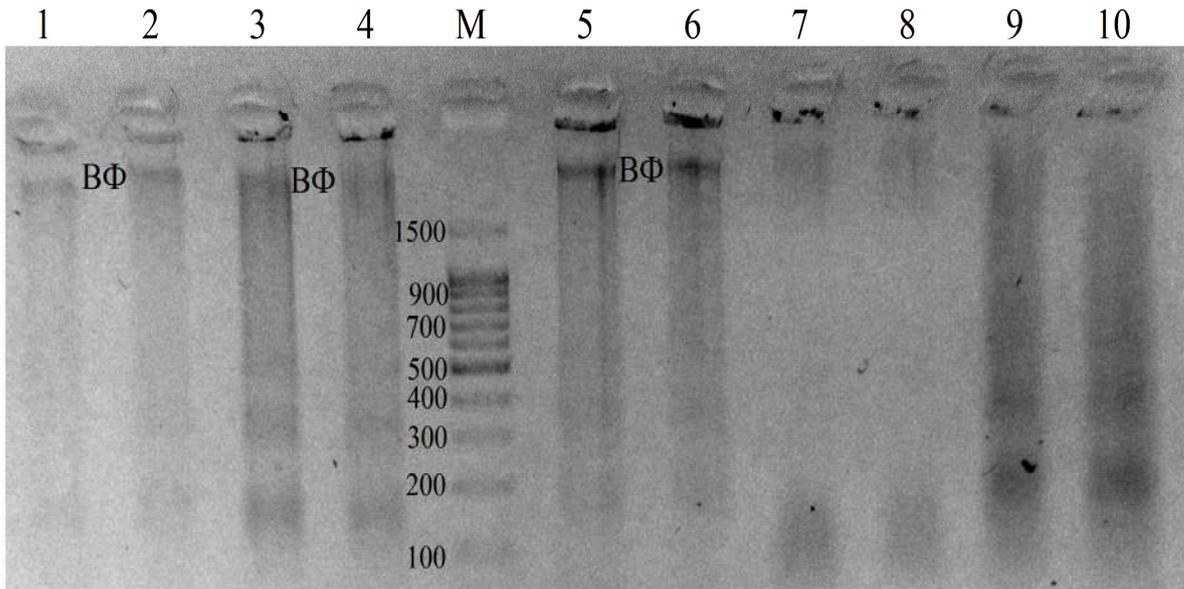


Рисунок 5.18 – Электрофореграмма апоптотической "ДНК-лестницы" (кратная 180-200 п.н. фрагментация ДНК), выделенной из тканей заражённых ВЯП НШ гусениц (по 3 гусеницы на 1 электрофорезную "дорожку") из разных групп эксперимента, погибших на 6-е сутки после обработки ДНК-фрагментами: 1,2 – контроль; 3,4 – oligo(A)-фрагмент (3 пмоль на гусеницу); М – маркер молекулярных весов ДНК; 5,6 – oligoBIR-фрагмент (3 пмоль на гусеницу); 7,8 – oligoRING-фрагмент (3 пмоль на гусеницу); 9,10 – oligoBIR-фрагмент + oligoRING-фрагмент (по 1,5 пмоль каждого из фрагментов ДНК на гусеницу); ВФ – высшая фракция геномной ДНК. Детекция апоптотической "ДНК-лестницы" была осуществлена при помощи "Quick apoptotic DNA ladder detection kit" (Life Technologies, США)

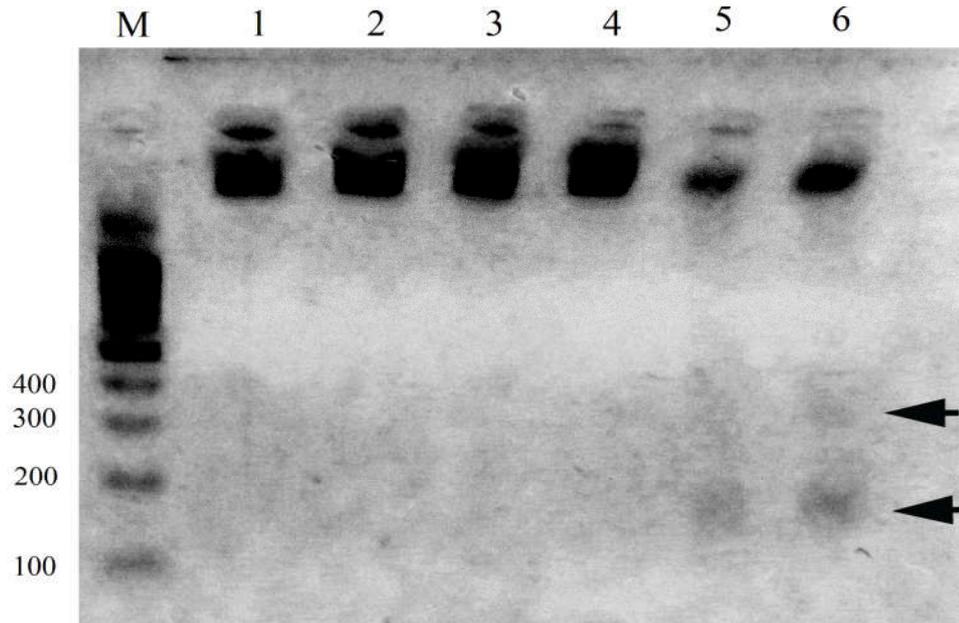


Рисунок 5.19 – Электрофореграмма апоптотической "ДНК-лестницы" (кратная 180-200 п.н. фрагментация ДНК), выделенной из тканей заражённых ВЯП НШ гусениц (по 3 гусеницы на 1 электрофорезную "дорожку") из разных групп эксперимента, выживших на 6-е сутки после обработки ДНК-фрагментами: 1,2 – контроль; М – маркер молекулярных весов ДНК; 3,4 – oligoCpG-фрагментом (3 пмоль/гусеницу); 5,6 – oligoRING-фрагментом (3 пмоль/гусеницу); стрелками обозначены фрагменты ДНК длиной около 180 и 360 п.н. Детекция апоптотической "ДНК-лестницы" была осуществлена при помощи "Quick apoptotic DNA ladder detection kit" (Life Technologies, США)

Нужно отметить, что апоптотическая "ДНК-лестница" была также обнаружена и у живых заражённых гусениц на 6-е сутки эксперимента (Рисунок 5.19). Однако у живых гусениц она встречалась только в группе "oligoRING". Возникновение ярко выраженной апоптотической "ДНК-лестницы" у живых особей непарного шелкопряда группы "oligoRING" наглядно показывает сдвиг биохимических реакций в сторону апоптоза под действием oligoRING-фрагмента.

Из полученных результатов следует, что заражённые ВЯП НШ гусеницы погибают вследствие более высокой активизации апоптотических процессов в

клетках по сравнению с контролем, а oligoRING-фрагмент больше других олигонуклеотидов способствуют их развитию. По-видимому, для oligoNB-фрагмента ещё будет найдена совершенно комплементарная поверхность мРНК гена, играющего значительную роль в системе взаимоотношений вирус-хозяин, чтобы объяснить полученные эффекты на заражённых вирусом гусеницах. Таким образом, короткий антисмысловой oligoRING-фрагмент повышает смертность как безвирусных, так и заражённых вирусом гусениц непарного шелкопряда, запуская выраженные апоптотические процессы в клетках вредителя. Это может быть использовано на практике для контроля численности насекомых-вредителей. Например, в настоящее время нет полной последовательности генома непарного шелкопряда, но секвенирована последовательность относительно короткого генома ВЯП НШ (в среднем около 161 000 п.н.) (Kuzio et al., 1999). В такой ситуации вирусная ДНК может дать ценную информацию о некоторых жизненно важных генах вируса, которые имеют клеточное происхождение, например, антиапоптозных генах (Hughes, 2002). Последовательность этих генов может быть использована для борьбы с насекомым. Перспектива такого подхода четко видна на практике, поскольку она обеспечивает инсектицидный эффект с меньшими усилиями. Например, вместо дорогого бакуловирусного препарата для контроля численности насекомых-вредителей можно использовать короткие антисмысловые ДНК-фрагменты бакуловирусного генома, синтез которых может быть полностью автоматизирован сегодня. Также возможно совместное применение бакуловирусных препаратов и антисмысловых фрагментов антиапоптозных генов бакуловирусов в практике сельского и лесного хозяйства с целью повышения эффективности первых. Такой подход в будущем может иметь перспективное значение и использоваться широкомасштабно для защиты растений при дальнейшем снижении цены на синтез и очистку ДНК-олигонуклеотидов.

Важно отметить, что деградация oligoRING-фрагмента клеточными дезоксирибонуклеазами (ДНКазами) и взаимодействие oligoRING-фрагмента с целевой мРНК антиапоптозного гена являются теми двумя конкурентными

процессами, от которых зависит ответ клетки на применённый олигонуклеотид. (Очевидно, что можно снизить экспрессию ДНКаз насекомого при помощи антисмысловых олигонуклеотидов, однако для этого нужна будет ещё одна обработка). Полученные результаты говорят о том, что в случае безвирусных насекомых будет преобладать первый процесс, а в случае заражённых ВЯП НШ гусениц – больше шансов для проявления второго. У безвирусных насекомых в отсутствие стресс-факторов концентрация целевой мРНК антиапоптозного гена будет находиться на низком уровне и вероятность взаимодействия с oligoRING-фрагментом будет мала. Напротив, когда в результате вирусной инфекции система апоптоза-антиапоптоза активизирована, то концентрация целевой мРНК становится больше, что было показано на примере экспрессии антиапоптозного IAP-1-гена непарного шелкопряда, а также суммарной экспрессии IAP-3-гена ВЯП НШ и IAP-Z-гена непарного шелкопряда. Следовательно, у антисмыслового фрагмента больше шансов для взаимодействия с комплементарной поверхностью целевой мРНК и её последующей деградации с участием РНКазы Н при наличии специфического стресс-фактора. В этой связи, контрольные одноцепочечные ДНК-фрагменты, которые не обладают сколько-нибудь весомой комплементарностью к целевой мРНК, будут в обоих случаях метаболизироваться ДНКазами. Для того, чтобы создать более универсальный ДНК-инсектицид, который не будет зависеть в большой степени от стресс-факторов, было принято решение создать антисмысловый олигонуклеотид на основе функционально важного гена, экспрессия которого постоянно находится на высоком уровне.

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

Интерес исследований распространился на рибосомальную РНК (рРНК) как еще одну возможную 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.

В качестве мишени для экспериментов с ДНК-инсектицидами была выбрана 5,8S рРНК в том числе потому, что она имеет успешную историю применения её фрагментов в качестве немодифицированных 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, 1997; Lo et al., 1987) и транслокации рибосом (Graifer et al., 2005), по крайней мере в универсально-консервативной последовательности GAAC, которая является общей для всех 5,8S РНК (Nazar, 1982). Последовательность, окружающая данную консервативную область, часто видоспецифична (Abou-Elela, 1997). Наиболее значительные и воспроизводимые ингибирования с несколькими различными немодифицированными антисмысловыми ДНК-олигонуклеотидами на ретикулоцитах кролика были получены для последовательностей, содержащих универсально-консервативную область 5'-GAAC-3'. 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 мутировавшие 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), комплементарный гену, кодирующему 5,8S рРНК, который включает в себя универсально консервативную антисмысловую последовательность 5'-GTTC-3'. Данный фрагмент был применён как контактный ДНК-инсектицид в экспериментах. Кроме этого, известно, что 5,8S рРНК одной из первой разрушается при иницировании апоптотических процессов в клетке (Mroczek, 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 также 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) (Рисунок 6.1). 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 6.1, 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 об активном синтезе новых веществ в ответ на ДНК-фрагмент.

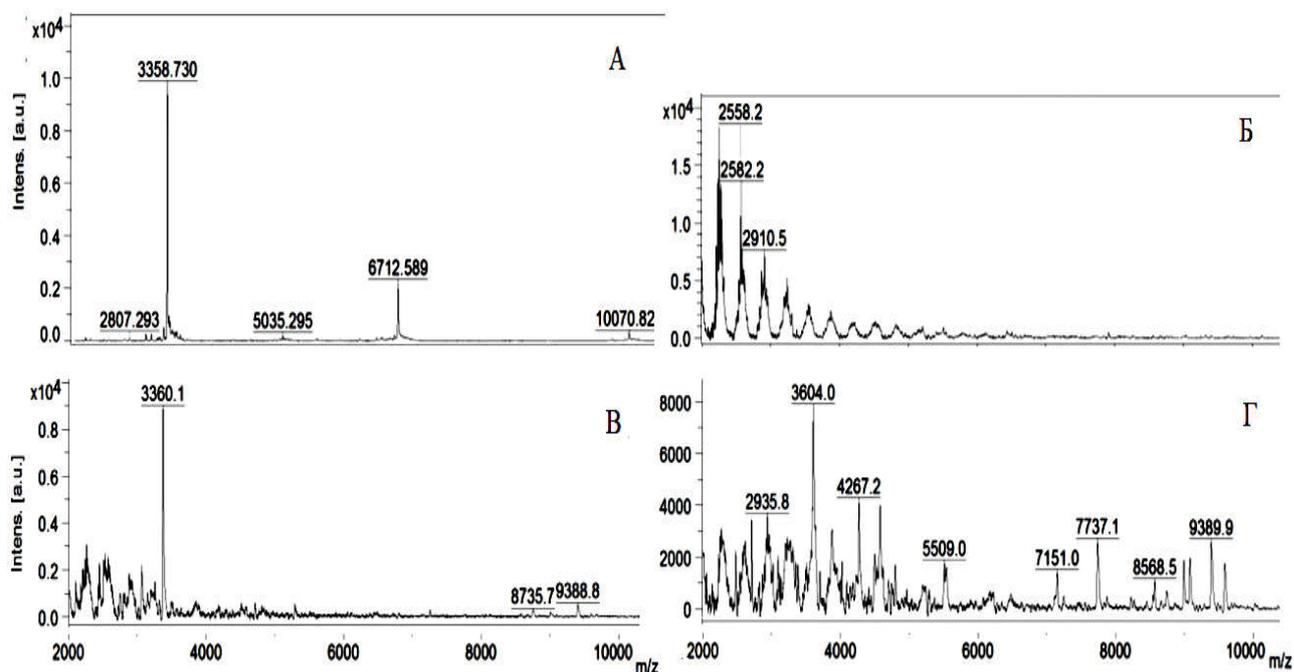


Рисунок 6.1 – Диаграмма пиков веществ, обнаруженных в образцах гомогената тканей отдельных гусениц шелкопряда методом МАЛДИ после контактной обработки oligoRIBO-11-фрагментом (0,9 нмоль/гусеницу): А – эталон oligoRIBO-11-фрагмента ( $3358,73 \pm 10$  Да), Б – контроль, В, Г – через 30 и 60 минут после высыхания капли соответственно. Анализ всех образцов был проведён после семи отмывок гусениц в воде и 70%-ном растворе спирта. Эксперимент был проведён трижды. Образцы были предварительно обессолены на колонках Illustra™ NAP™-5 G-25 Sephadex™ по инструкции производителя (GE Healthcare Life Sciences, США) и сконцентрированы

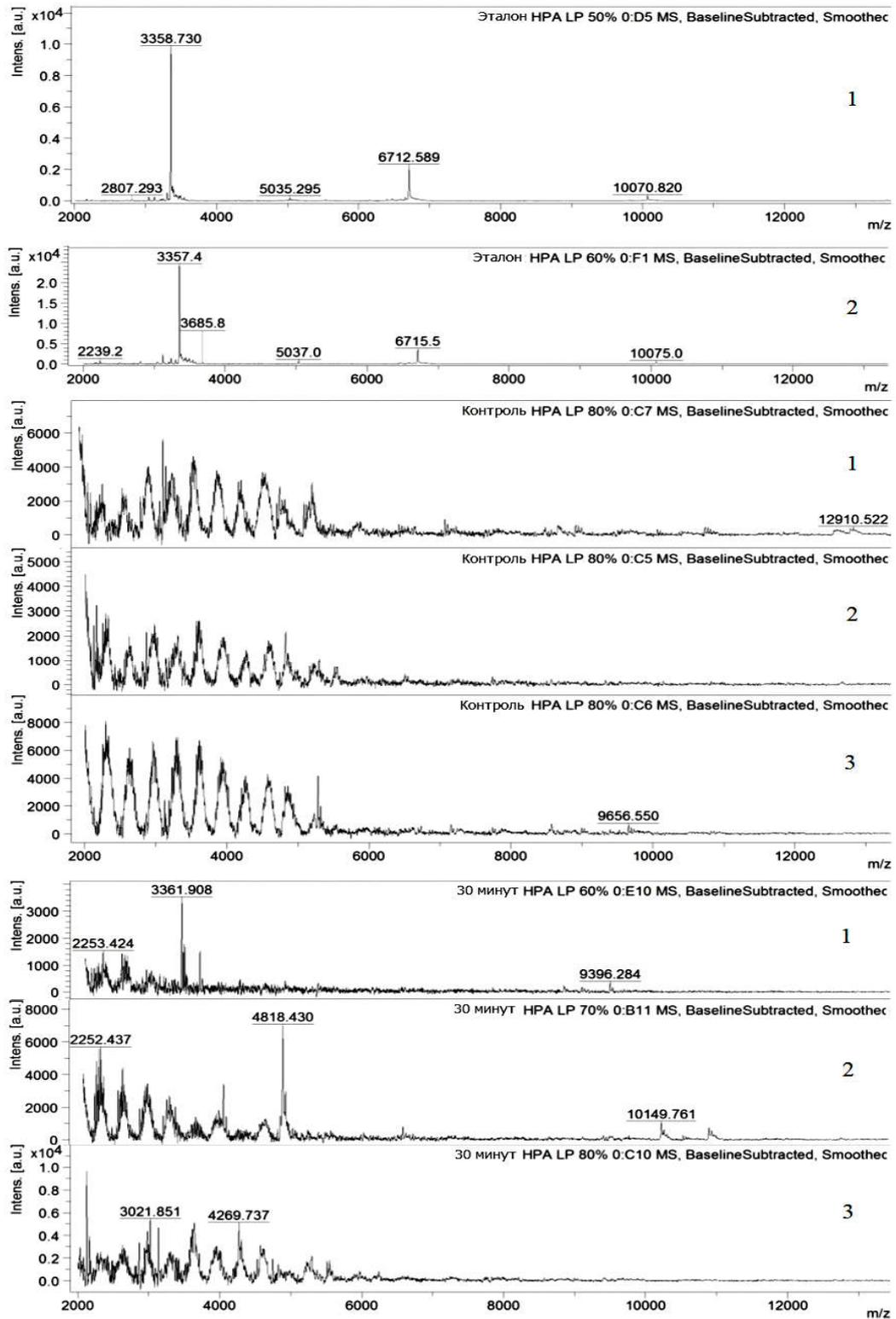


Рисунок 6.2 – Диаграмма пиков веществ, обнаруженных методом МАЛДИ в образцах гомогената тканей отдельных гусениц шелкопряда после контактной обработки oligoRIBO-11-фрагментом через 30 минут (0,9 нмоль/гусеницу): 1,2,3 –

повторности эксперимента. Контроль обработан водой. Эталон oligoRIBO-11-фрагмента –  $3358,73 \pm 10$  Да

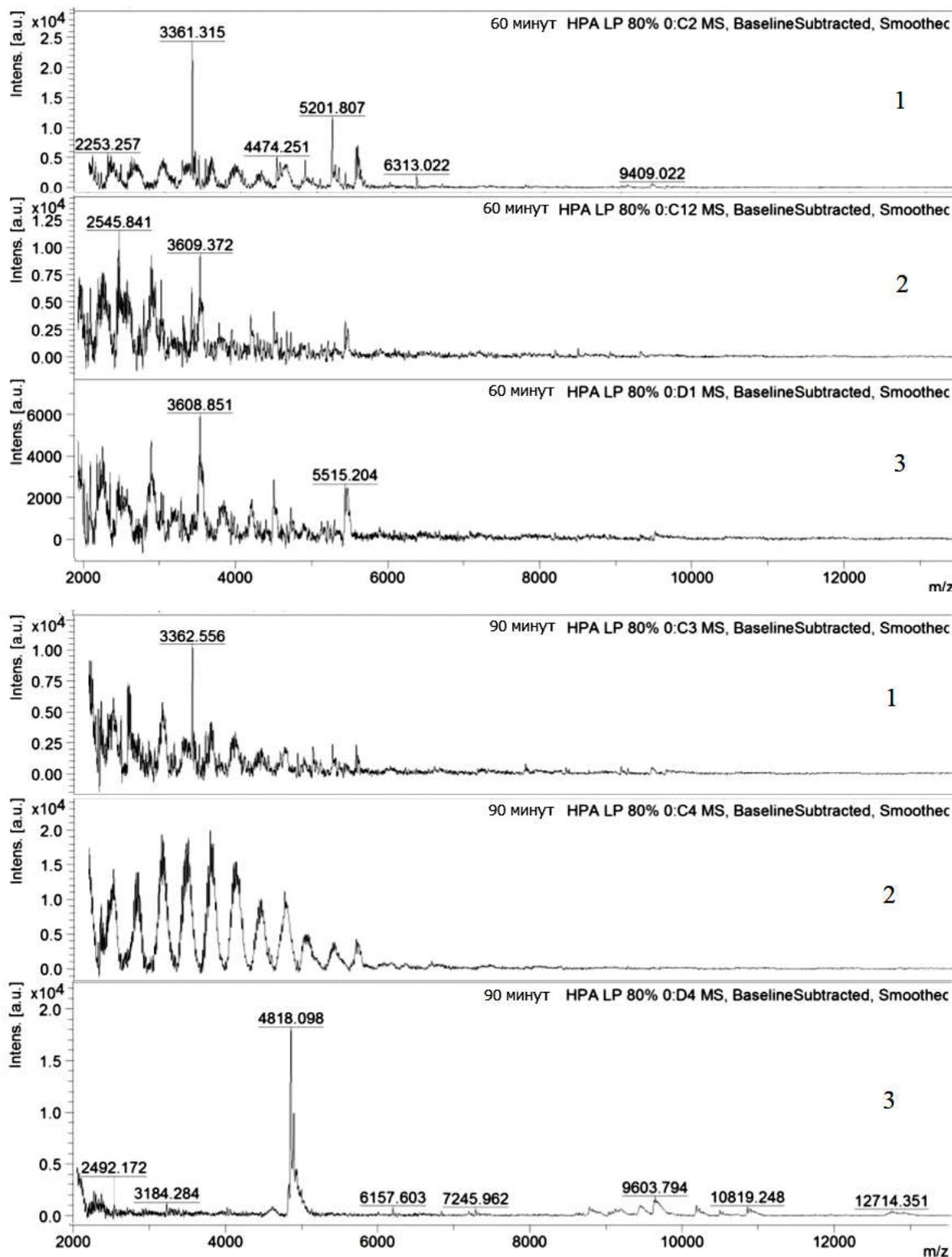


Рисунок 6.3 – Диаграмма пиков веществ, обнаруженных в образцах гомогената тканей отдельных гусениц шелкопряда методом МАЛДИ после контактной

обработки oligoRIBO-11-фрагментом (0,9 нмоль/гусеницу): 1, 2, 3 – повторности эксперимента (через 60 и 90 минут)

Наибольшее количество 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). Таким образом, короткие одноцепочечные ДНК-фрагменты способны проникать через покровы непарного шелкопряда.

После разделения в полиакриламидном геле и экстракции перхлоратом лития образованные *de novo* белково-пептидные вещества и олигонуклеотиды были проанализированы на спектрофотометре NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Исследования показали, что по своей природе значительное количество зарегистрированных *de novo* веществ относится к олигонуклеотидам с преимущественно более высокой молекулярной массой, чем oligoRIBO-11-фрагмент. Их размер находился в пределах от 3238 до 7151 Да. В контроле, обработанном водой, полностью отсутствовали фракции олигонуклеотидов в пределах от 3238 до 7151 Да. Нужно отметить, что присутствие oligoRIBO-11-фрагмента (3358,73±10 Да) в клетках насекомого фиксировалась во всех группах эксперимента (через 30, 60 и 90 минут), что отображает постепенное проникновение ДНК-олигонуклеотида в ткани шелкопряда (Рисунок 6.2 и Рисунок 6.3). Было показано, что в течение 90 минут через покровы насекомого в клетки шелкопряда проникает 33,9% oligoRIBO-11-фрагмента и 35,6% oligoRING-фрагмента (Таблица 6.1). Полученные результаты говорят о том, что в ответ на проникновение oligoRIBO-11-фрагмента (3358,73±10 Да) в клетку происходит синтез более длинных олигонуклеотидов. Очевидно, что сам oligoRIBO-11-фрагмент является затравкой для такого синтеза полимеразой.

Некоторые образованные в ответ на применение oligoRIBO-11-фрагмента вещества имели белково-пептидную природу и их размер находился в более широких пределах от 2680 до 13248 Да. Нужно отметить, что 13000-15000 Да является определённым пределом измерений для прибора Bruker Microflex

MALDI-TOF (Bruker, США) и не исключает образование белков и пептидов более высокой молекулярной массы в ответ на применение oligoRIBO-11-фрагмента.

Группа	Концентрация ДНК-фрагмента при обработке, нг/гусеницу	Концентрация ДНК-фрагмента через 90 минут, нг/гусеницу
Контроль	–	–
oligoRING	620,1	399,5±15,2
oligoRIBO-11	326,3	215,5±11,4

Таблица 6.1 – Снижение концентрации oligoRIBO-11-фрагмента и oligoRING-фрагмента на поверхности тела гусеницы в результате проникновения

## **6.2 Антисмысловой oligoRIBO-11-фрагмент вызывает смертность гусениц непарного шелкопряда, выращенных в лаборатории и устойчивых к oligoRING-инсектициду**

Используя гусениц шелкопряда 2-го возраста, выращенных в лаборатории и устойчивых к oligoRING-инсектициду, на 3-е сутки после контактной обработки было 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 6.4). 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 неполностью комплементарный oligoRIBO-11-фрагменту участок 5,8S рибосомальной РНК – 5'-СТТЦГААСГСА-3' вместо 5'-ТТТЦГААСГСА-3', что было обнаружено в ходе 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-фрагмент, как oligoRING-фрагмент, являются избирательными инсектицидами и специфичность их действия зависит от комбинации азотистых оснований во фрагменте, что будет более детально исследовано в разделе 7.

Также был протестирован oligoRIBO-11-инсектицид на личинках непарного шелкопряда, собранных в естественной среде обитания (дубовый лес, *Q. pubescens*). Эксперимент имел 5 повторностей по 15-20 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента. Достоверное увеличение смертности гусениц насекомого в группе "oligoRIBO-11" ( $\chi^2 = 30,3$ ;  $df=1$ ;  $N=178$ ;  $p < 0,01$ ) и группе "oligoRING" ( $\chi^2 = 23,8$ ;  $df=1$ ;  $N=174$ ;  $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем (вода) наблюдалось уже на 3-е сутки после обработки (Таблица 6.2).

Таблица 6.2 – Влияние oligoRIBO-11-фрагмента и oligoRING-фрагмента на смертность (%) гусениц непарного шелкопряда, собранных в природе

Сутки	Контроль-лес	oligoRIBO-11-лес	oligoRING-лес
3-и	0	$28,3 \pm 5,2^*$	$23,4 \pm 8,7^*$
6-и	0	$46,9 \pm 9,3^*$	$25,3 \pm 8,2^*$

Примечание: достоверное различие в смертности по сравнению с контролем обозначено \* при  $p < 0,01$ . Средние значения и стандартные ошибки средних даны для 5 повторностей

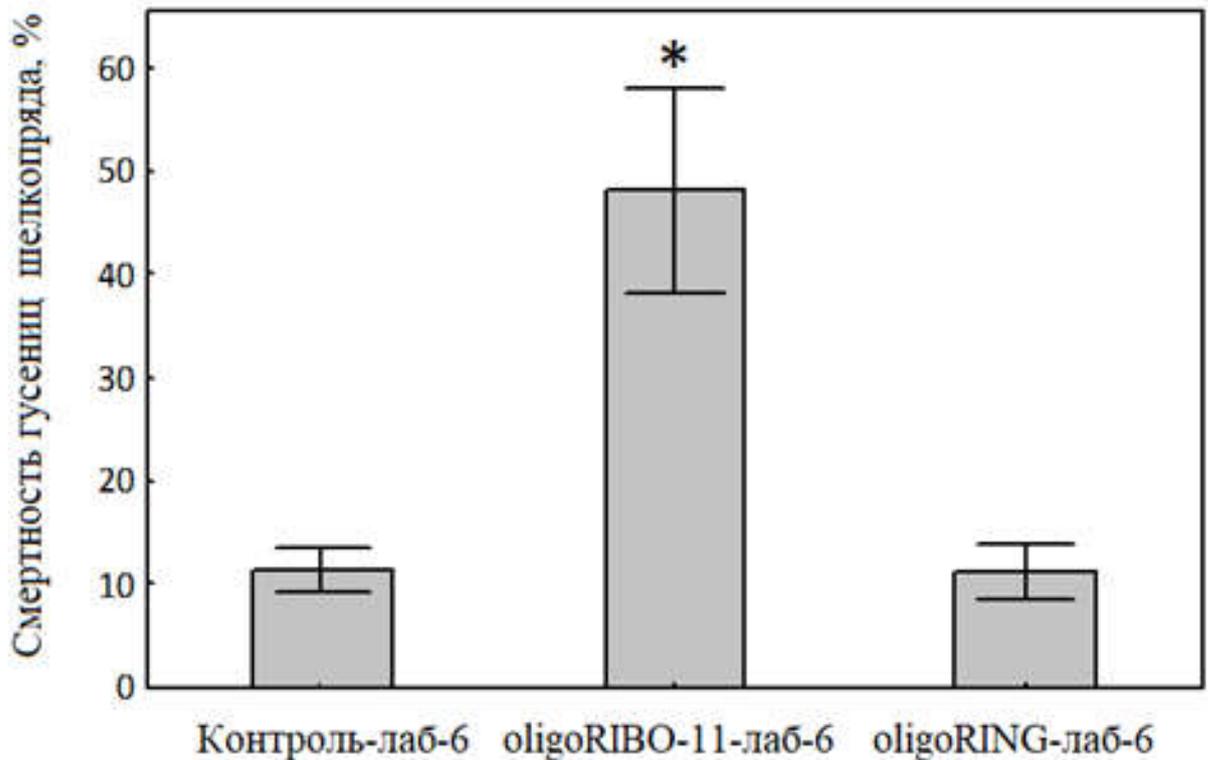


Рисунок 6.4 – Влияние oligoRIBO-11-инсектицида (6 пмоль/гусеницу) на смертность гусениц непарного шелкопряда, выращенных в лаборатории и устойчивых к oligoRING-инсектициду через 6 суток после контактной обработки.

Достоверность различий в группе "oligoRIBO-11" по сравнению с контролем обозначено \* при  $p < 0,01$ . Эксперимент имел 5 повторностей по 15-20 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

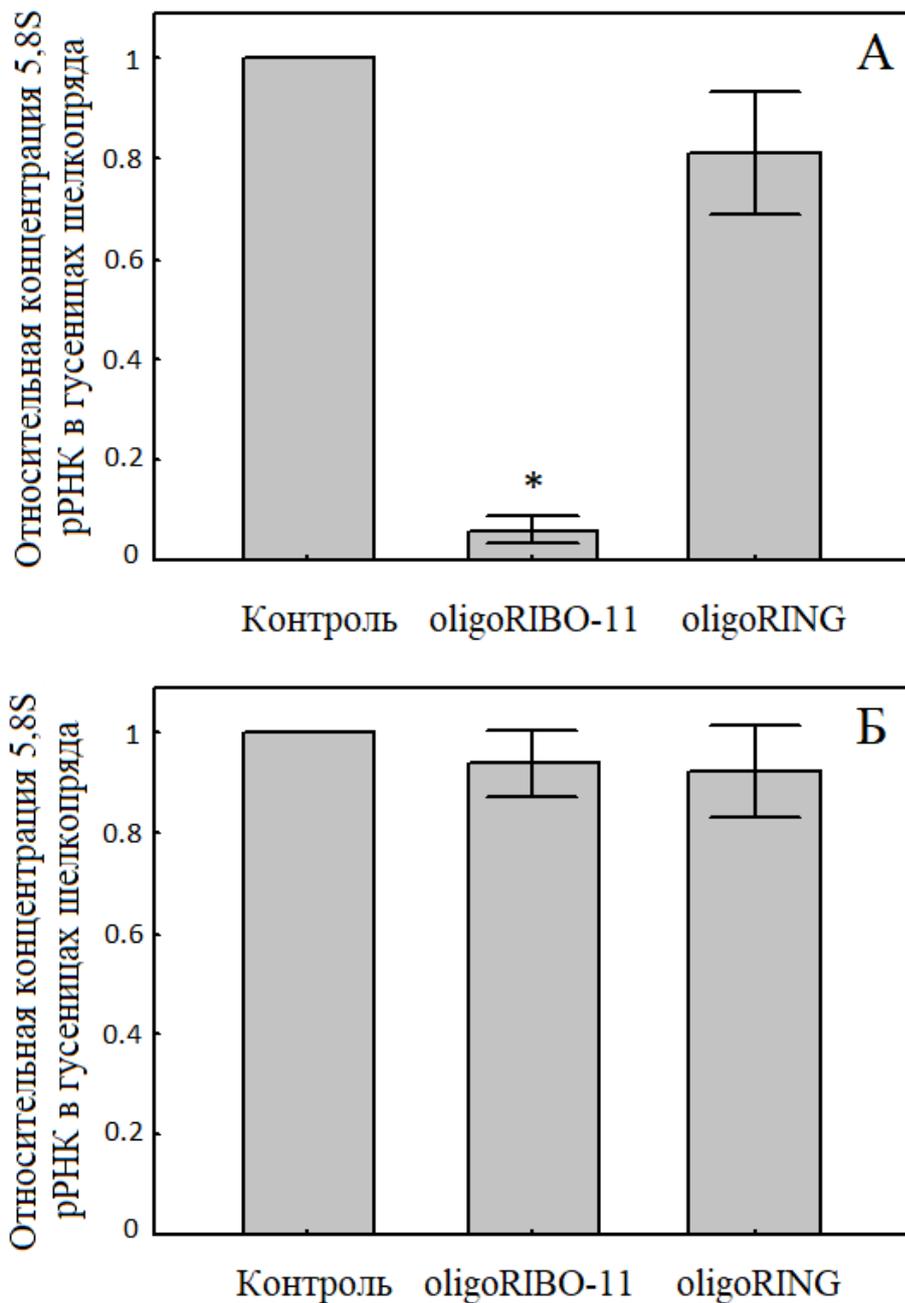


Рисунок 6.5 – Относительная концентрация 5,8S рибосомальной РНК в гусеницах непарного шелкопряда через 6 суток (А) и 12 суток (Б) после обработки ДНК-олигонуклеотидами. В каждой группе было проанализировано по 12 особей. Достоверность различий между группой "oligoRIBO-11" и контрольной группой (вода) обозначена \* при  $p < 0,01$

В среднем, 28,3%, 23,4% и 0% гусениц погибло в группах, обработанных oligoRIBO-11-фрагментом, oligoRING-фрагментом и водой соответственно. На 6-е сутки после обработки oligoRIBO-11-фрагмент и oligoRING-фрагмент статистически достоверно увеличили смертность насекомых по сравнению с контролем, обработанным водой ( $\chi^2=58,9$ ;  $df=1$ ;  $N=178$ ;  $p<0,01$  для группы "oligoRIBO-11" против контрольной группы и  $\chi^2=26,3$ ;  $df=1$ ;  $N=174$ ;  $p<0,01$  для группы "oligoRING" против контрольной группы). Процент погибших насекомых достиг 46,9% (группа "oligoRIBO-11"), 25,3% (группа "oligoRING") и 0% (вода) (Таблица 6.2). Таким образом, oligoRIBO-11-фрагмент и oligoRING-фрагмент достоверно увеличили смертность насекомого по сравнению с контрольной группой. Следует отметить, что oligoRIBO-11-фрагмент оказался в 1,85 раза более эффективным инсектицидом, чем oligoRING-фрагмент, приведя к гибели почти половину особей непарного шелкопряда в течение 6 суток. Таким образом, в отличие от oligoRING-инсектицида, oligoRIBO-11-инсектицид более эффективен, действует быстрее, более доступен (так как oligoRING-фрагмент длиннее на 38,9%), что делает его перспективным кандидатом для создания готового препарата для контроля численности безвирусных гусениц шелкопряда.

### **6.3 OligoRIBO-11-фрагмент снижает концентрацию 5,8S рРНК в клетках гусениц непарного шелкопряда**

На сегодняшний день имеется много доказательств того, что ДНК-инсектициды работают по механизму действия немодифицированных (Dias, 2002) и модифицированным антисмысловых олигонуклеотидов (Toth, 2011), используемых в медицине, генерируя антисмысловые эффекты при помощи механизма РНКазы Н-зависимой деградации РНК (Schultz, 2008; Mayr et al., 2017). РНКазы Н гидролизует цепь РНК в дуплексе РНК/ДНК, деградируя тем самым целевую РНК и, как следствие, останавливает биосинтез целевого белка. На 6-е сутки после обработки ДНК-олигонуклеотидами было решено проверить

относительную концентрацию 5,8S рибосомальной РНК у гусениц непарного шелкопряда, выращенных в лаборатории. Известно, что 28S и 5,8S рибосомальные РНК составляют до 85-90% общей клеточной РНК (Paule, 2000). В нескольких исследованиях было показано, что 5,8S рибосомальная РНК является очень надёжной в качестве внутреннего контроля (Rebouças et al., 2013; Liu et al., 2015), обеспечивая точный анализ методом ПЦР в реальном времени.

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 (Рисунок 6.5, А). Таким образом, oligoRIBO-11-поддерживаемая РНКазы Н-зависимая деградация целевой 5,8S рРНК, важной части белоксинтезирующего комплекса, была достаточно эффективной ( $p < 0,01$ ).

Нужно отметить, что концентрация 5,8S рРНК выровнялась по сравнению с контролем ( $p > 0,05$ ) на 12-е сутки у выживших гусениц, обработанных oligoRIBO-11-инсектицидом (Рисунок 6.5, Б). Это означает, что не все насекомые восприимчивы к контактному ДНК-инсектициду или способны быстро восстановить нормальную концентрацию 5,8S рибосомальной РНК в клетках.

После гистологических исследований, которые будут обсуждаться ниже, было сделано предположение, что большое влияние на эффективность ДНК-инсектицида имеет близость гусеницы к линьке. Чем ближе линька, тем менее эффективен ДНК-инсектицид. Это связано с тем, что у личинок, готовых к линьке, есть два слоя кутикулы (старый и новый), разделенные межкутикулярным пространством. Межкутикулярное пространство, заполняемое ДНК-инсектицидом для достижения живых тканей насекомого, существенно увеличивается с приближением линьки (Рисунок 6.6; П1, ж). Очевидно, что это может являться причиной более затруднительного проникновения водного раствора ДНК-инсектицида в ткани шелкопряда и может потребовать нескольких обработок в природе, чтобы попасть в "подходящее" время. В подтверждение данной гипотезы нужно отметить, что при изучении проникновения oligoRIBO-11-фрагмента в клетки насекомого методом МАЛДИ, встречались профили пиков особей, которые совпадали с контролем (Рисунок 6.3, 90 минут, 2-я повторность).

#### 6.4 Свидетельства снижения уровня биосинтеза белка в тканях гусениц непарного шелкопряда, обработанных oligoRIBO-11-фрагментом

Был применён ещё один подход – гистологические исследования (Рисунок 6.6), 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 снижения площади цитоплазмы), что характерно для клеток с низкой степенью дифференцировки (в группе контроля соотношение было  $0,28 \pm 0,05$ , а в группе "oligoRIBO-11" –  $0,42 \pm 0,06$ ;  $n=6$ ;  $p < 0,01$ ). Наибольшие изменения наблюдались в ядрах, где увеличилось количество гетерохроматина, он конденсировался крупными глыбками вдоль кариолеммы, уменьшилось число и размер ядрышек по сравнению с контролем (Рисунок 6.6; 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 6.6; М1, б; М2, б, в). 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 всём их протяжении (Рисунок 6.6; 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 6.6; K1, д, е; K2, 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.

Среди протестированных на непарном шелкопряде шести ДНК-фрагментов только целевые антисмысловые олигонуклеотиды (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 контрольных олигонуклеотидов "oligoA", "oligoBIR", "oligoHB" и "oligoCpG" 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 на целевом насекомом. В природных сообществах или агроценозах чаще будет иметь место другая ситуация – один ДНК-инсектицид и много организмов, из которых, как правило, только один является целевым. Этому вопросу посвящён раздел 7.

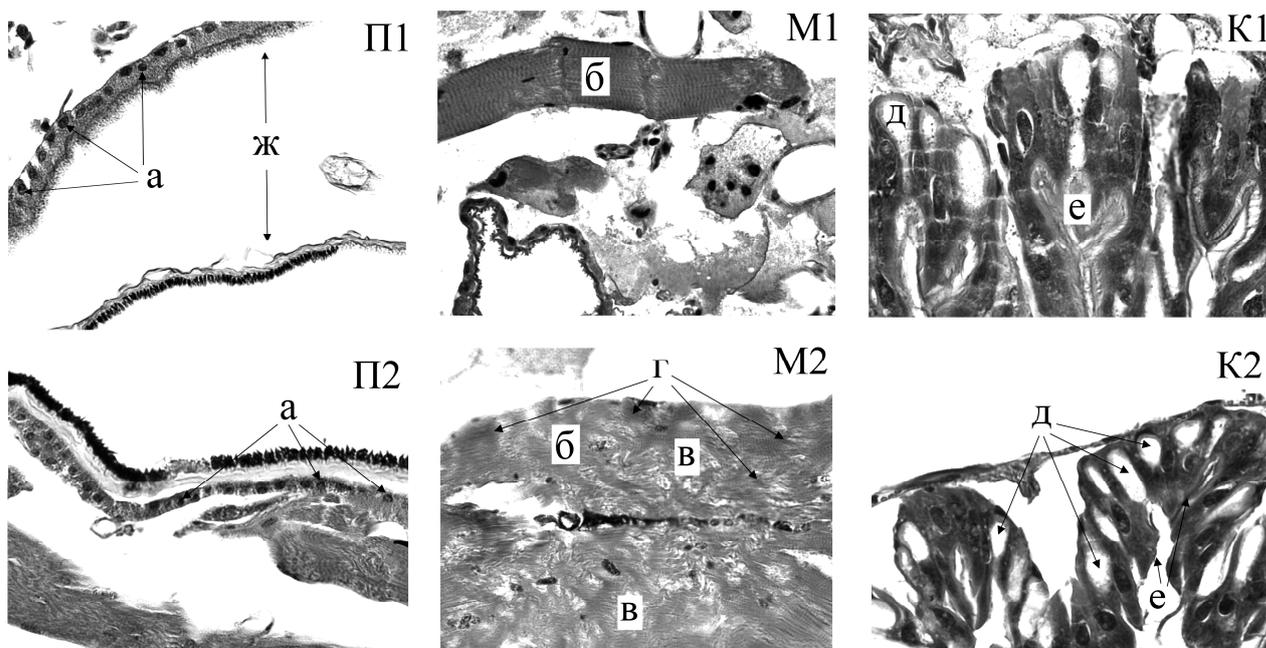


Рисунок 6.6 – Световая микроскопия гистологических срезов гусениц непарного шелкопряда через покровы насекомых (П), мышечный пучок (М) и среднюю кишку (К). П1, М1, К1 – контроль (вода): а – равномерное распределение гетерохроматина, хорошо выраженные ядрышки; б – упорядоченные мышечные волокна с хорошо выраженной поперечной исчерченностью; д – бокаловидные клетки; е – высокие реснички эпителиальных клеток; ж – межутикулярное пространство. П2, М2, К2 – гусеницы, обработанные oligoRIBO-11 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

## РАЗДЕЛ 7

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

Важно отметить, что современные химические инсектициды обладают биоактивными свойствами и при попадании в окружающую среду неизбежно происходит их включение в процессы биоаккумуляции и биотрансформации. 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 присутствуют дезоксирибонуклеазы, обеспечивающие деградацию нуклеиновых кислот. В этой связи для 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).

**7.1 Биоразлагаемость oligoRIBO-11-фрагмента и oligoRING-фрагмента с участием тканевых дезоксирибонуклеаз**

Исследования показали высокую активность внутриклеточных дезоксирибонуклеаз (ДНКаз) непарного шелкопряда и дуба пушистого, которые полностью деградировали oligoRIBO-11-фрагмент и oligoRING-фрагмент за 24 часа (Рисунок 7.1). Сходные результаты были с гомогенатом тканей тела дождевого червя *Lumbricus terrestris* L. как представителя редуцентов и с

гомогенатом кишечника серой крысы *Rattus norvegicus* Berk. как консумента более высокого порядка, чем непарный шелкопряд (Рисунок 7.2).

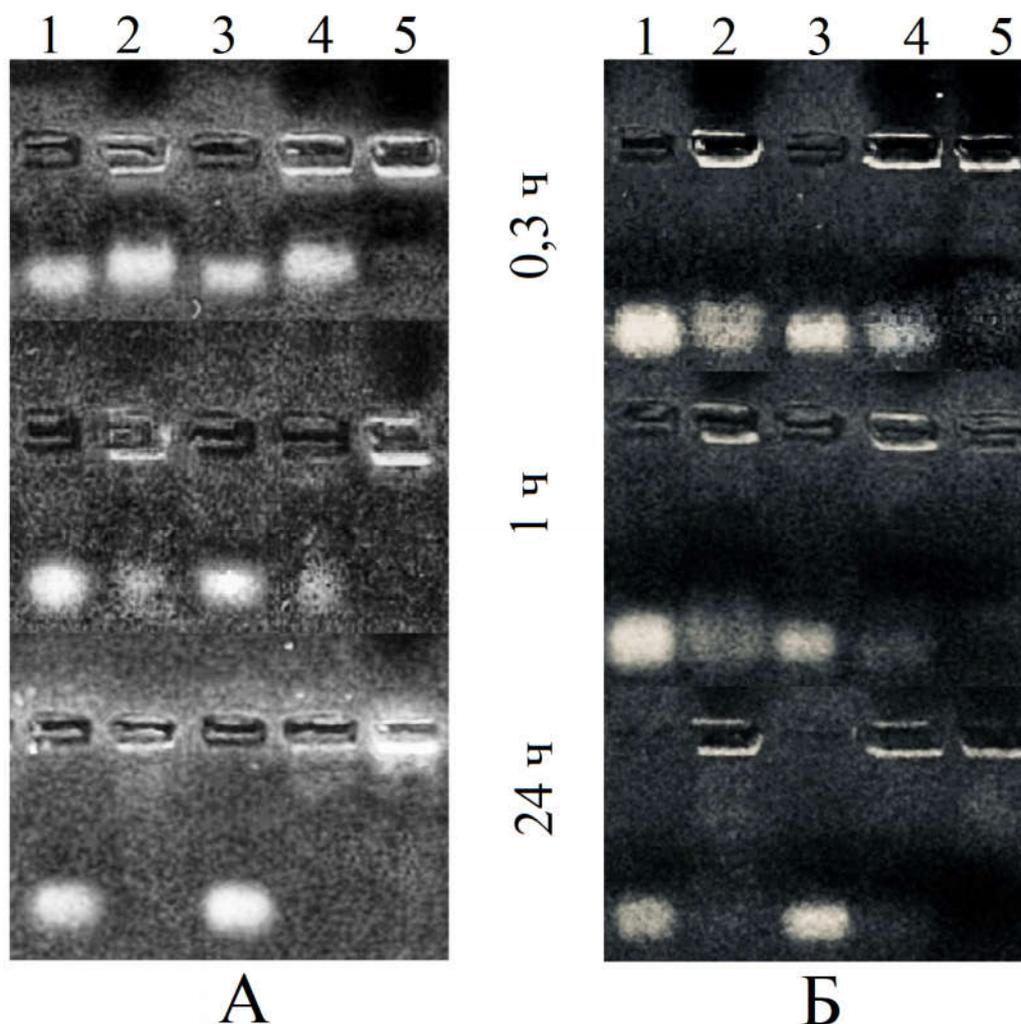


Рисунок 7.1 – Электрофореграмма (1,8%-ного агарозного геля), отображающая активность внутриклеточных ДНКаз непарного шелкопряда (А) и дуба пушистого (Б) после 0,3, 1 и 24 часов инкубации при 27 °С: 1 – контроль (10 мкл oligoRIBO-11-фрагмента в концентрации 150 пмоль/мкл); 2 – гомогенат ткани (1,5 мг 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)

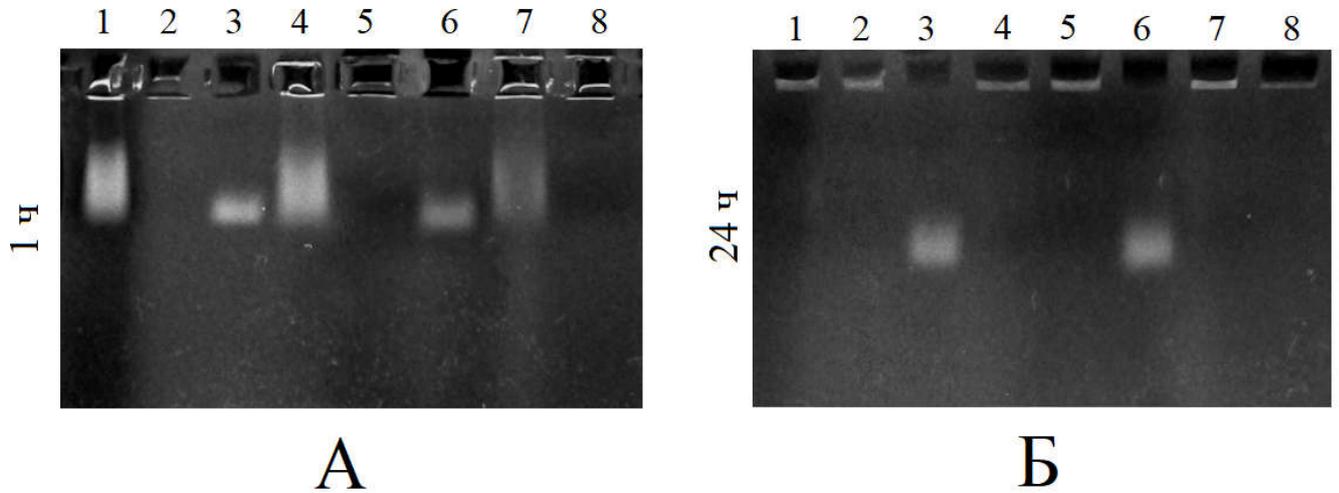


Рисунок 7.2 – Электрофореграмма (1,8%-ного агарозного геля), отображающая активность внутриклеточных ДНКаз дождевого червя и серой крысы после 1 (А) и 24 (Б) часов инкубации при 27 °С: 1 – гомогенат ткани кишечника крысы (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды); 2 – гомогенат ткани тела червя (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды); 3 – контроль (10 мкл oligoRING-фрагмента в концентрации 5 пмоль/мкл); 4 – гомогенат ткани кишечника крысы (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды) + 10 мкл oligoRING-фрагмента в концентрации 5 пмоль/мкл; 5 – гомогенат ткани тела червя (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды) + 10 мкл oligoRING-фрагмента в концентрации 5 пмоль/мкл; 6 – контроль (10 мкл oligoRIBO-11-фрагмента в концентрации 150 пмоль/мкл); 7 – гомогенат ткани кишечника крысы (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды) + 10 мкл oligoRIBO-11-фрагмента в концентрации 150 пмоль/мкл; 8 – гомогенат ткани тела червя (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды) + 10 мкл oligoRIBO-11-фрагмента в концентрации 150 пмоль/мкл

Хотя предполагается, что во время лесозащитных мероприятий только около 0,1% инсектицида достигнет тканей насекомых-вредителей (Pimentel, 1995; Carriger et al., 2006), а 99,9% попадут в почву и водоёмы, во всех этих местах обитания есть организмы, которые содержат вездесущие дезоксирибонуклеазы, способные разрушить ДНК-инсектициды. Таким образом, в отличие от химических инсектицидов, ДНК-инсектициды не накапливаются в тканях живых организмов. Являясь эффективными против конкретного насекомого-вредителя, они реализуют принцип высокоизбирательных инсектицидов, являющихся острой необходимостью для сельского и лесного хозяйства сегодня.

Нужно отметить, что, используя ДНК-инсектициды на основе высококонсервативных последовательностей генов (антиапоптозных, генов, кодирующих рибосомальную РНК и др.), можно уменьшить количество используемых неизбирательных химических инсектицидов с длительным периодом полураспада, к которым сравнительно быстро возникает устойчивость со стороны насекомых-вредителей. Такой подход снизит экотоксикологическую нагрузку и закрепит за определённой территорией (ареалом обитания целевого насекомого-вредителя) видоспецифичный ДНК-инсектицид. По сути, можно подобрать и применить такую последовательность антисмыслового олигонуклеотида длиной 11-20 нуклеотидов, в котором мутации происходят с низкой частотой (1 раз в 100-1000 лет). На примере oligoRING-фрагмента было продемонстрировано, что это возможно. Разные штаммы ВЯП НШ, циркулирующие в разных популяциях непарного шелкопряда и имеющие разное влияние со стороны факторов среды, что обуславливает их разные пути микроэволюции, содержат идентичную последовательность 5'-CGA CGT GGT GGC ACG GCG-3' (oligoRING-фрагмент) в IAP-3-гене. OligoRING-фрагмент обнаружен во всех 12 геномах ВЯП НШ, представленных в GenBank к данному моменту, и считается консервативным (Таблица 7.1). Можно предположить, что широкомасштабное применение ДНК-инсектицидов повлияет на повышение частоты мутаций в консервативных участках целевых генов насекомых-вредителей. Однако такие клеточные механизмы неизвестны и маловероятны.

Таблица 7.1 – Присутствие (да/нет) oligoRING-фрагмента в геномах ВЯП НШ

№	Штамм вируса	Код штамма в GenBank	Да/нет
1	<i>Lymantria dispar</i> multiple nucleopolyhedrovirus strain 3029	Accession: KM386655.1 GI: 723048031	Да
2	<i>Lymantria dispar</i> multiple nucleopolyhedrovirus strain Ab-a624	Accession: KT626572.1 GI: 1003315467	Да
3	<i>Lymantria dispar</i> multiple nucleopolyhedrovirus strain 3054	Accession: KT626570.1 GI: 1003315114	Да
4	<i>Lymantria dispar</i> multiple nucleopolyhedrovirus strain 3041	Accession: KT626571.1 GI: 1003315288	Да
5	<i>Lymantria dispar</i> multiple nucleopolyhedrovirus isolate 2161, complete genome	Accession: KF695050.2 GI: 816130748	Да
6	<i>Lymantria dispar</i> multiple nucleopolyhedrovirus isolate LdMNPV- 27/0	Accession: KY249580.1 GI: 1147723069	Да
7	<i>Lymantria dispar</i> multiple nucleopolyhedrovirus isolate LdMNPV- 27/2, complete genome	Accession: KP027546.2 GI: 1015665528	Да
8	<i>Lymantria dispar</i> multiple nucleopolyhedrovirus isolate RR01	Accession: KX618634.1 GI: 1079501940	Да
9	<i>Lymantria dispar</i> multiple nucleopolyhedrovirus isolate LdMNPV- 45/0	Accession: KU862282.1 GI: 1003703903	Да
10	<i>Lymantria dispar</i> multiple nucleopolyhedrovirus isolate BNP	Accession: KU377538.1 GI: 1043642183	Да
11	<i>Lymantria dispar</i> MNPV	Accession: NC_001973.1 GI: 9630966	Да
12	<i>Lymantria dispar</i> nucleopolyhedrovirus	Accession: AF081810.1 GI: 3822234	Да

## 7.2 Нецелевые насекомые

Контактная обработка oligoBIR-фрагментом и oligoRING-фрагментом IAP-3-гена ВЯП НШ (30 пмоль/гусеницу, по 15 пмоль каждого из ДНК-фрагментов) личинок каролинского бражника *Manduca sexta* L., совки-ипсилон *Agrotis ipsilon* Hufnagel и шелкопряда-монашенки *L. monacha* не привела к снижению их выживаемости. Данные насекомые, как и непарный шелкопряд, относятся к отряду чешуекрылых, что говорит о высокой видоспецифичности oligoRING-инсектицида. В группах эксперимента на 11-е сутки исследований не было обнаружено достоверной смертности по сравнению с контролем ( $p > 0,05$ ). Доза применённых ДНК-фрагментов на мг массы тела непарного шелкопряда в экспериментах, где был показан достоверный инсектицидный эффект, была чаще меньше (в 0,5-17 раз), чем для нецелевых насекомых. Данный факт указывает на весомый запас прочности в безопасности действия ДНК-инсектицидов.

Таблица 7.2 – 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

Примечание: эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 15-20 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

Дополнительно было изучено накопление биомассы гусеницами нецелевых насекомых после обработки ДНК-олигонуклеотидами (Таблица 7.3). Достоверных различий в накоплении биомассы в группах эксперимента по сравнению с контролем обнаружено не было ( $p > 0,05$ ).

Таблица 7.3 – 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

Примечание: эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 15-20 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

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 клеток на применённые ДНК-фрагменты.

Для oligoRING-фрагмента также была показана избирательность в действии (отсутствие инсектицидного эффекта) на личинках самшитовой огнёвки *Cydalima perspectalis* Walker со средней массой  $145,1 \pm 1,73$  мг при использовании 30 пмоль/гусеницу ( $p > 0,05$ ) на 14-е сутки (Таблица 7.4) и личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say со средней массой  $30,6 \pm 2,1$  мг при использовании 10 пмоль/личинку на 7-е сутки ( $p > 0,05$ ). Кроме этого, на личинках колорадского жука было показано отсутствие достоверного влияния oligoRING-фрагмента на накопление биомассы насекомым (Рисунок 7.3). Личинки самшитовой огнёвки и колорадского жука были собраны в природе. Нужно подчеркнуть, что в сходных условиях oligoRING-фрагмент IAP-3-гена ВЯП НШ вызвал достоверное повышение смертности и снижение биомассы гусениц непарного шелкопряда, собранных в природе, что указывает на избирательность действия применённого ДНК-инсектицида, разработанного против непарного шелкопряда.

Таблица 7.4 – Количество (%) погибших на 14-е сутки особей самшитовой огнёвки после обработки ДНК-фрагментами

	контроль	oligoFT	oligoRING
самшитовая огнёвка	10,25 ± 5,3	12,1 ± 6,8	24,3 ± 9,6

Примечание: эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 20-30 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

Была также изучена избирательность действия ДНК-инсектицида на основе oligoBIR-фрагмента (5'-ACC CAT AGA GTT GGC AAT-3') и oligoRING-фрагмента (5'-CGA CAT GAC CGC AAG GTA-3') антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП металлоидки серой *Trichoplusia ni* Hübner (Таблица 7.5). Из представленных на 7-е сутки данных видно, что применённый в концентрации 30 пмоль/насекомое ДНК-инсектицид безопасен для имаго амбарного долгоносика *Sitophilus granarius* L. и гусениц совки-ипсилон. Дальнейшее выращивание гусениц в течение недели не привело к достоверному увеличению смертности в опытных группах.

Таблица 7.5 – Количество (%) выживших на 7-е сутки гусениц амбарного долгоносика и совки-ипсилон после обработки ДНК-фрагментами

	контроль	oligoA	oligoBIR+oligoRING
амбарный долгоносик	100	100	100
совка-ипсилон	96,7 ± 3,3	80 ± 10	86,7 ± 3,3

Примечание: эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 15-20 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

Известно, что продукты разрушения одноцепочечных ДНК-фрагментов (2'-дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфатов) обладают кратковременным неспецифическим антипрофелиративным эффектом (Vaerman et al., 1997). Нужно

отметить, что на линии *ebony Drosophila melanogaster* Meigen фиксировался достоверный инсектицидный эффект при совместном использовании oligoBIR-фрагмента и oligoRING-фрагмента IAP-3-гена ВЯП НШ ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 7.4). Личинки погружались в раствор с ДНК-фрагментами в концентрации 100 пмоль/мкл на 20 минут. На линии *white* дрозофилы при понижении концентрации до 20 пмоль/мкл наблюдалось повышение жизнеспособности насекомого ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 7.5). Контролем служил случайный декануклеотид (5'-TGC GCA GCC С-3'; olig35-фрагмент). Данный факт указывает на неспецифическое действие ДНК-фрагментов, проявляющееся при определённых условиях.

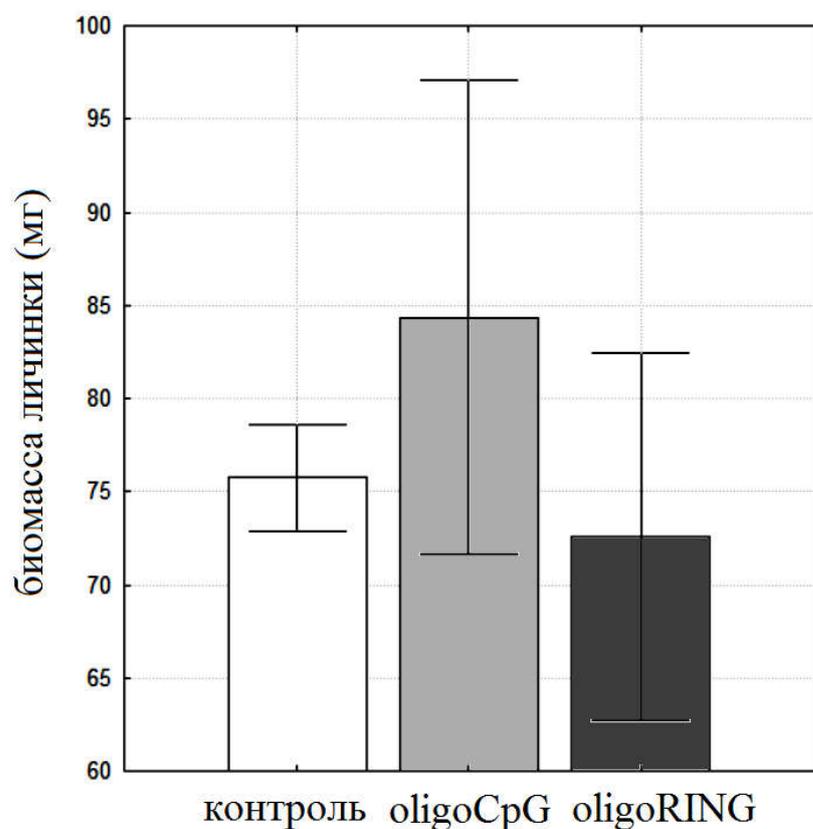


Рисунок 7.3 – Средняя биомасса личинок колорадского жука на 7-е сутки после их контактной обработки ДНК-олигонуклеотидами (oligoRING-фрагментом и oligoCpG-фрагментом) и водой. Эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 15-20 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

Нужно отметить, что в исследованиях с гусеницами шелкопряда при использовании oligoRING-фрагмента IAP-3-гена ВЯП НШ никогда не наблюдалась достоверно более высокая выживаемость вредителя по сравнению с контролем. Однако в одном из экспериментов на выращенных в лаборатории гусеницах непарного шелкопряда oligoRING-фрагмент в концентрации 3 пмоль/гусеницу вызвал достоверно более высокое накопление биомассы насекомым на 7-е сутки исследования по сравнению с контролем:  $3,24 \pm 0,02$  мг ( $n=3$ ) в группе "oligoRING" против  $4,27 \pm 0,17$  мг ( $n=3$ ) в контроле ( $p < 0,05$ ). На 14-е сутки биомасса насекомого в группе "oligoRING" выровнялась по сравнению с контролем ( $p > 0,05$ ). По-видимому, при отсутствии инсектицидного действия со стороны oligoRING-фрагмента, когда система апоптоза-антиапоптоза насекомого не активизирована, oligoRING-фрагмент способен оказать неспецифическое воздействие на непарного шелкопряда. Похожий эффект стимулирования накопления биомассы шелкопрядом был получен для oligoCpG-фрагмента и oligoBIR-фрагмента.

Была поставлена задача методом ПЦР проанализировать при помощи oligoBIR-фрагмента и oligoRING-фрагмента IAP-3-гена ВЯП НШ в качестве праймеров геном дрозофилы на присутствие в них областей (фрагментов антиапоптозных генов), которые гомологичны антиапоптозному IAP-3-гену ВЯП НШ и IAP-Z-гену непарного шелкопряда. Отсутствие таких областей давало бы молекулярно-генетическое обоснование отсутствию специфического инсектицидного действия oligoRING-фрагмента на дрозофилу.

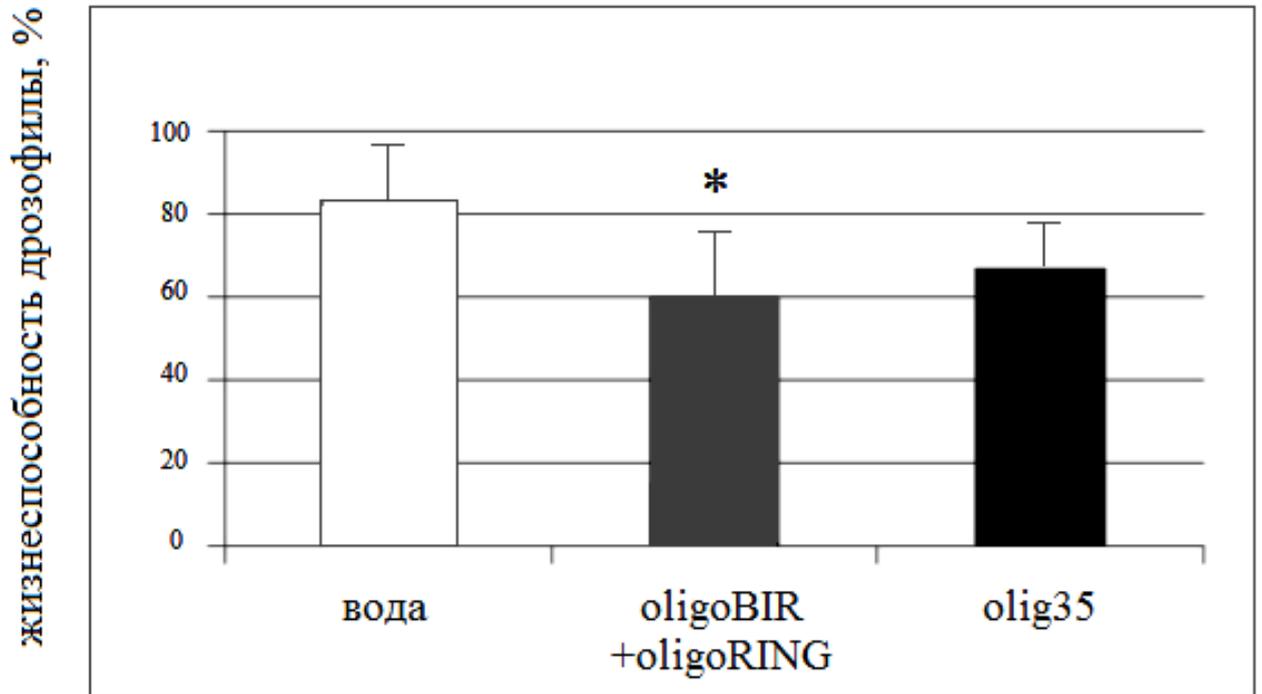


Рисунок 7.4 – Выживаемость (особи, дошедшие до стадии имаго) дрозифилы линии *ebony* в разных группах эксперимента после обработки личинок ДНК-фрагментами. Достоверность понижения выживаемости насекомого в группе "oligoBIR+oligoRING" против контроля обозначена \* при  $p < 0,05$  ( $\chi^2 = 4,87$ ;  $df = 1$ ;  $N = 75$ ). Эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 10-15 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

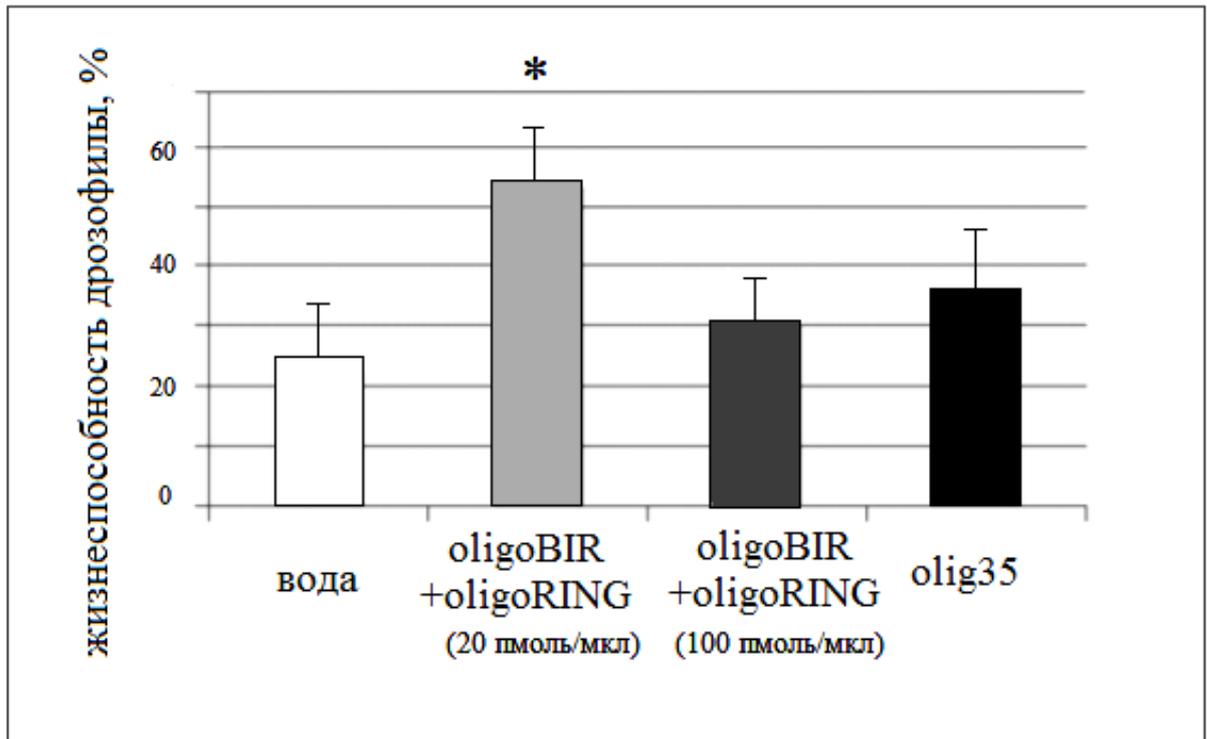


Рисунок 7.5 – Выживаемость (особи, дошедшие до стадии имаго) дрозифилы линии white в разных группах эксперимента после обработки личинок ДНК-фрагментами. Достоверность выживаемости насекомого в группе "oligoBIR+oligoRING" против контроля обозначена \* при  $p < 0,01$  ( $\chi^2 = 7,99$ ;  $df = 1$ ;  $N = 80$ ). Эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 10-15 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

В ходе ПЦР были получены (Рисунок 7.6) и секвенированы (Рисунок 7.7) ампликоны, которые были выровнены относительно последовательности фрагмента IAP-3-гена ВЯП НШ, амплифицированной при помощи oligoBIR-фрагмента и oligoRING-фрагмента в качестве праймеров. Анализ секвенированной последовательности S дрозофилы при помощи программы BLASTN (Zhang et al., 2000) показал, что он принадлежит некодирующей части хромосомы 3L (97% идентичности). Таким образом, обнаруженные эффекты снижения (Рисунок 7.4) и повышения жизнеспособности (Рисунок 7.5) дрозофилы под влиянием фрагментов IAP-3-гена ВЯП НШ очевидно не связаны с инактивацией экспрессии какого-либо функционально важного гена насекомого, в том числе антиапоптозного, а связано с неспецифическими реакциями клетки.

Таким образом, ДНК-инсектициды против непарного шелкопряда и металлоидки серой в подавляющем большинстве случаев проведённых экспериментов были избирательными в действии и не проявили инсектицидного эффекта на нецелевых насекомых. 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. 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 контроля каждого отдельного насекомого-вредителя может быть создан свой "oligoRING-фрагмент" и "oligoRIBO-11-фрагмент", который будет безопасен для нецелевых организмов. В этом лежит основа природоподобности подхода ДНК-инсектицидов и их высокого уровня экологичности.

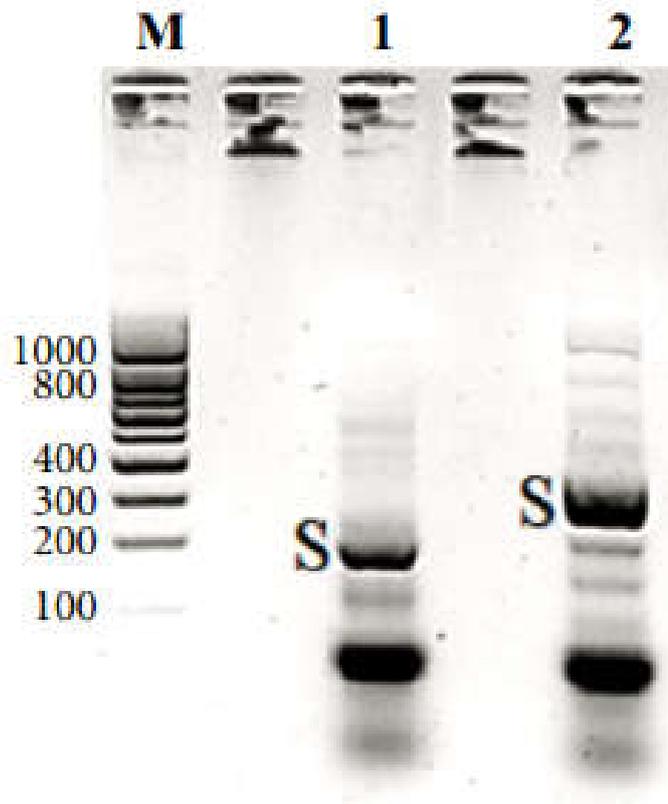


Рисунок 7.6 – Продукты амплификации ДНК непарного шелкопряда (1) и *D. melanogaster* (2) с oligoBIR-фрагментом и oligoRING-фрагментом IAP-3-гена ВЯП НШ в качестве праймеров; С – отрицательный контроль; М – маркер молекулярных весов ДНК; S – ампликоны, взятые для секвенирования

```

НШ IAP-X -----
дрозофила S  CTTCTCAGCTTTTCTCGGCGCTCACGTGTAATTTTCTCACATAAATCATTAAACCTGC
ВЯП НШ IAP-3 -----GCCGGCGGAACTGGCCCCACGCGGGCTTCT

НШ IAP-X -----
дрозофила S  GCAGCAGCCGCAGCACATTGACATTGTCAGAGGCTTTGCACCCACTTAGGGCATCCCTTT
ВЯП НШ IAP-3 ATTGCGCGAACCGCCAAGATTTTGTGAAGTGCGCCTATTGCCACATCGAAATCGGCAATT

НШ IAP-X -----GATTAAGTCTGCCATTACACACTAGACCACCAGACGCTCAGCG-CACC
дрозофила S  TGGAGACCACCCCGCTCGCTTCCCTTTGGAGGCTCCTTCTTCCGGCTCTATCT-TTCG
ВЯП НШ IAP-3 GGTCTGATCGGCAGCGACGCCATGTCCGACCACAAGCGCTACTCGCCCGCTTGCCGGTTCTG
                *      *      *

НШ IAP-X TCATCCCACGC ---GGAGATTCTCGACAC --GTCCCGTC-ATCACTAGCAAGCCCAGCA
дрозофила S GAAGGCCGCTCTTTTGATAGCAATCAACGC --GGGGAGCGGATTGGTGGCCATTCTGAGT
ВЯП НШ IAP-3 TCTGCGAGCTCATAAAGAGGCCCGTGTGCGCCGGTCGAGCGCCGAGACGACGACGACGAAG
                *      *      *      *      *

НШ IAP-X GTAATAGTTACAG--CTCAC-TCATCTGCATTCTTCTCCTAACATTCCAGGACAGCCCC
дрозофила S ACTCCAGTCATCATTCTCAC-TCATCCTCATCTGAAAATCTAAAGCTCAGGTGCATCTAT
ВЯП НШ IAP-3 ACGACGAGGAGGACTCGGCCGCCGAGCCCCGCCCGCGGGCGGCGA-GCTGCTGTGCTCCGTT
                *      *      *      *      *

НШ IAP-X TGGACACGACCGTTGGGTGCCCCGA---AGACGCCGTGCCACCACGTCG----
дрозофила S TC-ATAGATCCTTTGGATTCTTCATG-GGGCGCCGTGCCACCACGTCGA---
ВЯП НШ IAP-3 TGCCTGGACGCGCAACGCGAAATAATGTTTTCGCCGTGCCACCACGTCG----
                *
                *****
                комплементарен oligoRING

```

Рисунок 7.7 – Последовательность фрагмента IAP-3-гена ВЯП НШ из GenBank (KY249580.1; 317 п.н.), выровненная по секвенированным ампликонам фрагмента IAP-X-гена непарного шелкопряда (202 п.н.) и фрагмента генома (S) *D. melanogaster* (344 п.н.). Звёздочками (\*) отмечены места совпадений

### 7.3 Нецелевые растения

Современная концепция защиты растений, 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 снижают такие биохимические показатели, как содержание глюкозы (Habiba et al., 1992) и активность щелочной фосфатазы (Mishra, 2008). Было оценено негативное влияние oligoRING-инсектицида на концентрацию глюкозы и активность щелочной фосфатазы дуба черешчатого *Quercus robur* L. и яблони домашней *Malus domestica* Borkh. как одних из самых повреждаемых непарным шелкопрядом растений.

Через сутки после обработки ДНК-олигонуклеотидами листьев дуба черешчатого было зафиксировано достоверное снижение концентрации глюкозы в группе "oligoRING" на  $28,5 \pm 3,6\%$  по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). На 7-е сутки эксперимента содержание глюкозы в группе "oligoRING" по сравнению с контролем стало несущественным ( $p > 0,05$ ) (Рисунок 7.8). Глюкоза активно участвует в таких процессах, как запасание энергии, метаболизм углерода и азота, прорастание семян, цветение, а также гибель клеток (Dekkers et al., 2004; Rolland et al., 2006). Исследования в этой области показывают, что отсутствие сахара в клетках может вызвать последовательные изменения в клеточных реакциях, таких как снижение уровня дыхания, деградации липидов, белков и т.д. В экспериментах с химическими инсектицидами, имидаклопридом и профенофосом, было показано, что они приводят к длительному снижению концентрации глюкозы в картофеле и томатах (Habiba et al., 1992). Причиной этого снижения могут быть изменения в ферментативных процессах, контролирующих расщепление крахмала (Chauhan et al., 2013). OligoRING-фрагмент привёл к снижению концентрации глюкозы в листьях дуба черешчатого, однако по сравнению с химическими инсектицидами (Habiba et al., 1992) данный негативный эффект был кратковременным.

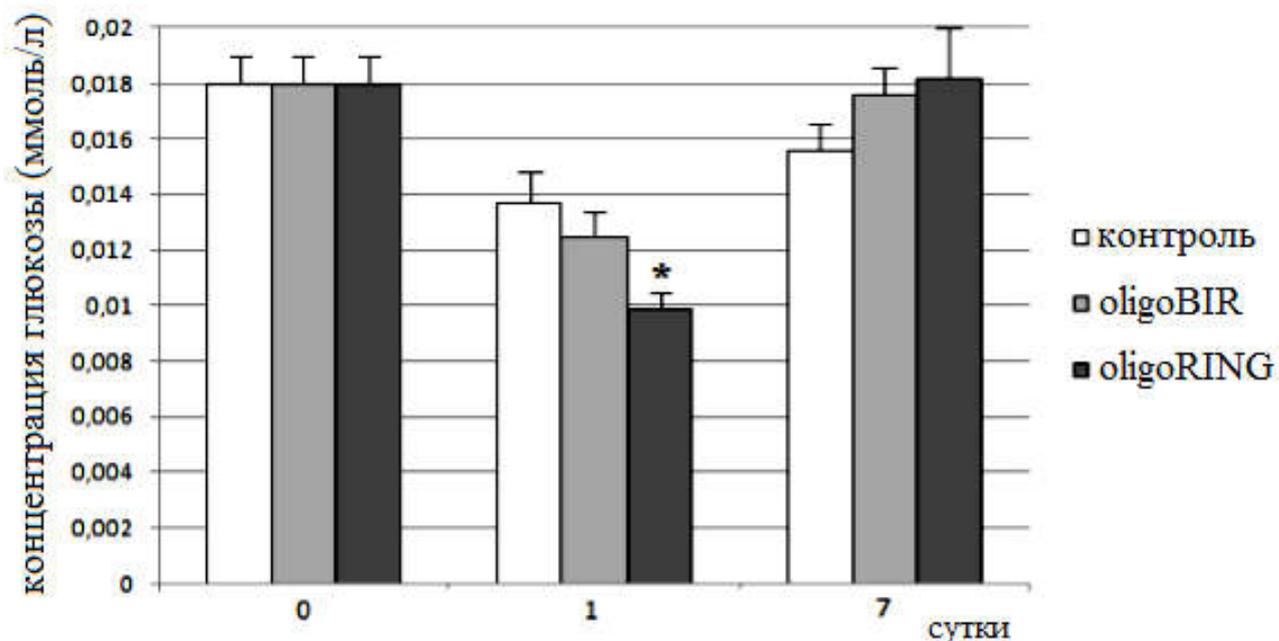


Рисунок 7.8 – Динамика изменения содержания глюкозы (ммоль/л) в листьях дуба черешчатого, обработанных ДНК-олигонуклеотидами в концентрации 5 пмоль/см<sup>2</sup>. Снижение содержания глюкозы в листьях дуба группы "oligoRING" против контроля обозначено \* при  $p < 0,05$ . Эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 12 листьев для одной повторности каждого варианта эксперимента

Сходные результаты были получены при изучении динамики изменения активности щелочной фосфатазы в проростках яблони домашней, обработанных ДНК-фрагментами (Рисунок 7.9). Через сутки в группе "oligoRING" было обнаружено достоверное снижение активности щелочной фосфатазы по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ), однако на 7-е сутки активность щелочной фосфатазы выровнялась ( $p > 0,05$ ). Таким образом, oligoRING-инсектицид не оказал длительного негативного влияния на изученные биохимические показатели листьев дуба и проростков яблони домашней.

Известно, что щелочная фосфатаза является гидролизующим ферментом. Наиболее эффективно щелочная фосфатаза проявляет свои свойства в щелочной

среде, удаляя фосфатную группу из многих типов молекул, в том числе нуклеотидов, алкалоидов, белков (Trowsdale, 1990). Свободно растворимые запасы фосфатов играют жизненно важную роль в переносе энергии, регуляции метаболизма, транскрипции генов, а также они являются важным структурным компонентом биомолекул, таких как белки и нуклеиновые кислоты (Duff et al., 1994). Активность фосфолитических ферментов, таких как кислая фосфатаза, щелочная фосфатаза и АТФаза, претерпевают значительные изменения у растений в стрессовых условиях, таких как засоление почв (Ehasanpour, 2003), осмотический стресс (Szabo-Nagy et al., 1992), избыток тяжелых металлов (Shah, 1998), воздействие химических веществ (Mishra, 2008) и др.

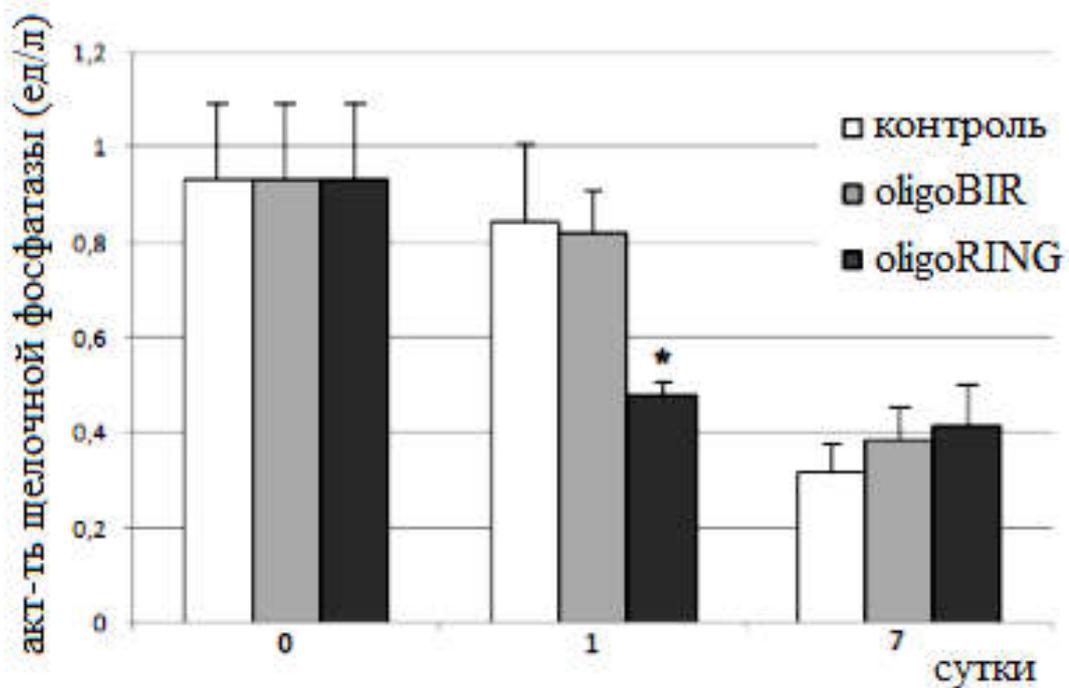


Рисунок 7.9 – Динамика изменения активности щелочной фосфатазы (ммоль/л) в проростках яблони домашней, обработанных ДНК-олигонуклеотидами в концентрации 5 пмоль/см<sup>2</sup>. Снижение активности щелочной фосфатазы в листьях группы "oligoRING" против контроля обозначено \* при  $p < 0,05$ . Эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 9 проростков для одной повторности каждого варианта эксперимента.

Таким образом, щелочная фосфатаза может служить маркером стресса в клетках растений. Короткий антисмысловый oligoRING-фрагмент IAP-3-гена ВЯП НШ достоверно снизил активность щелочной фосфатазы в проростках яблони домашней через 24 часа после обработки, что является показателем стресса, возникшего в растительных клетках в ответ на применённый ДНК-олигонуклеотид. Негативное влияние на активность щелочной фосфатазы было краткосрочным и исчезло через 7 суток, что указывает на более быстрый метаболизм олигонуклеотидов в клетке по сравнению с химическими агентами, обладающих длительным периодом полураспада в тканях живых организмов. Это согласуется с данными, представленными в подразделе 7.1.

Дополнительно исследовалось влияние oligoRING-фрагмента на накопление сухой биомассы проростками пшеницы (Рисунок 7.10). Из представленных 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.

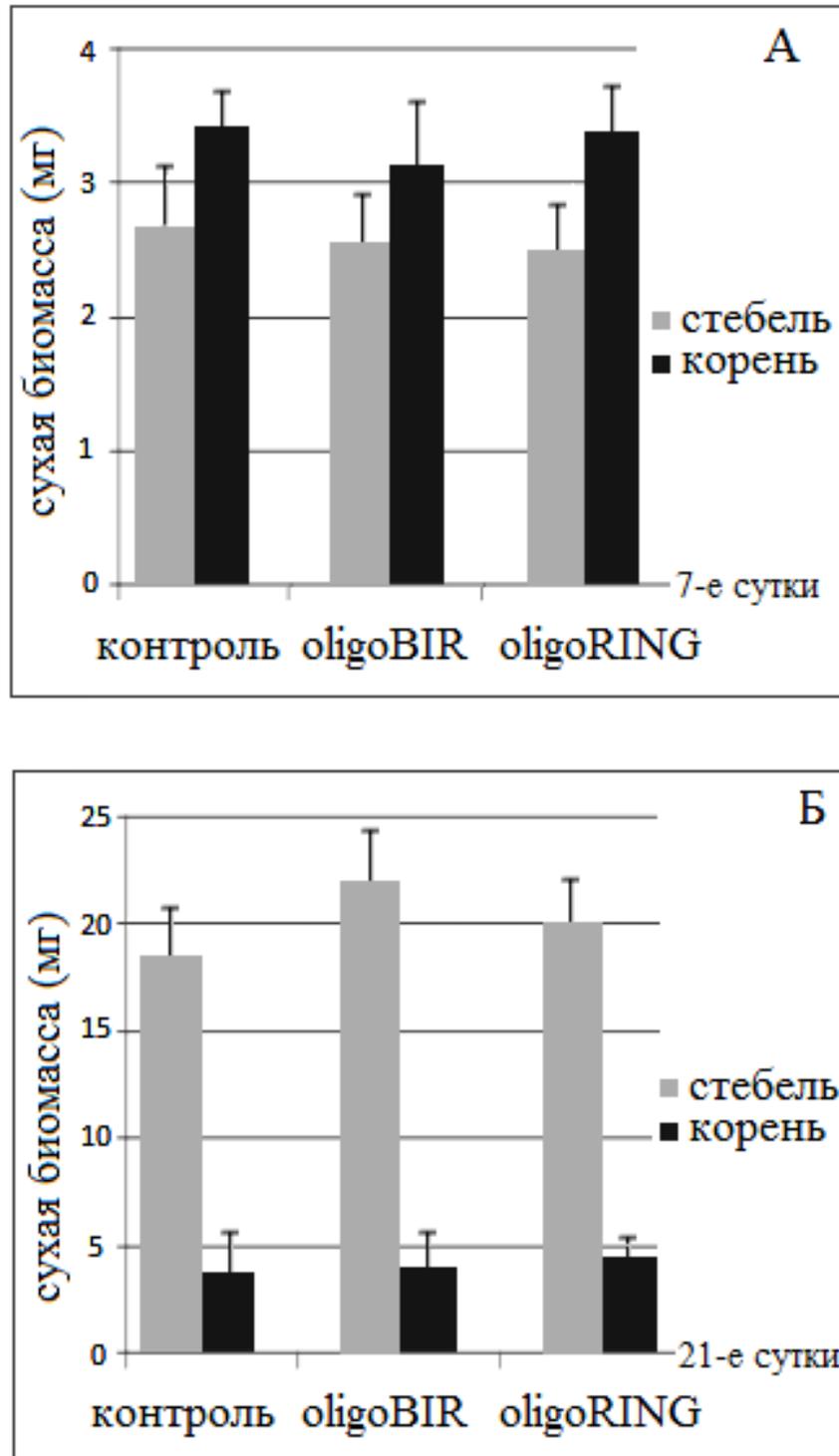


Рисунок 7.10 – Средняя сухая биомасса стебля и корня проростков пшеницы мягкой в разных группах эксперимента на 7-е (А) и 21-е (Б) сутки. Зёрна пшеницы были замочены в растворах с ДНК-олигонуклеотидами в концентрации 100 пмоль/мл в течение 2-х суток, после этого проростки были перенесены на среду Хогланда. Эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 20 проростков для одной повторности каждого варианта эксперимента

Неспецифическое действие олигонуклеотидов, показанное как для нецелевых насекомых, так и для нецелевых растений, должно быть изучено более детально, чтобы снизить экологические риски при возможном широкомасштабном применении ДНК-инсектицидов в сельском и лесном хозяйстве. Вместе с тем в агроценозах уже сейчас можно пробовать применять ДНК-инсектициды, так как количество нецелевых организмов там гораздо меньше, чем в природных экосистемах. При этом практически невозможно представить себе ситуацию, при которой традиционные химические инсектициды окажутся менее безопасными, чем ДНК-инсектициды. Łozowicka et al. (2015) в рамках части Программы национального мониторинга в Польше продемонстрировали, что в 64,2% образцах фруктов содержались остатки химических пестицидов, 5-я часть из которых превышала допустимую норму содержания химических агентов в плодах (стандарт ЕС. 396/2005). Наиболее часто в плодах встречались остатки карбаматов, пиретроидов, дифеноканозола, боскалида. Полученные результаты указывают на серьезность ситуации для безопасности здоровья людей и необходимость создания эффективных препаратов на основе природных молекул, имеющие короткий период полураспада.

Для оценки возможного негативного воздействия oligoRING-инсектицида на экспрессию важных для жизни растений генов была исследована экспрессия гена, кодирующего фермент риболузобифосфаткарбоксилазу/оксигеназу (РуБисКО) в листьях картофеля *Solanum tuberosum* L. на 14-е сутки после обработки ДНК-олигонуклеотидами (Рисунок 7.11). 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). OligoRING-фрагмент вызвал в  $2,1 \pm 0,6$  раз более высокую экспрессию данного гена по сравнению с контролем. Однако она оказалась недостоверной ( $p > 0,05$ ). Сходная тенденция была получена и для oligoA-фрагмента.

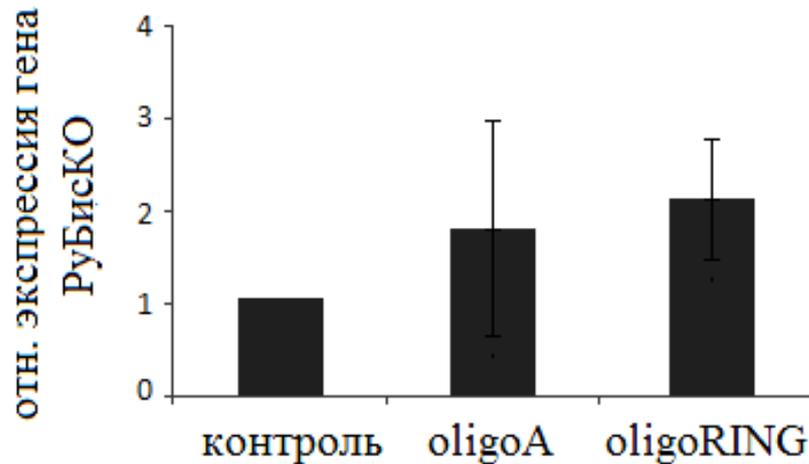


Рисунок 7.11 – Относительная экспрессия гена RuBisCO в листьях картофеля на 14-е сутки после обработки ДНК-олигонуклеотидами в концентрации 5 пмоль/см<sup>2</sup>. Экспрессия гена RuBisCO в контрольных группах (вода) взята за 1 (100%). Эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 8-10 листьев для одной повторности каждого варианта эксперимента

Таким образом, отсутствие угнетения экспрессии гена RuBisCO в группе "oligoRING" по сравнению с контролем является ещё одним доказательством безопасности oligoRING-инсектицида для нецелевых растений. Нужно отметить, что увеличение содержания RuBisCO в листьях приводит к более высокому уровню ассимиляции CO<sub>2</sub> во время фотосинтеза, что имеет важное агрономическое значение с точки зрения увеличения продуктивности растений (Parry et al., 2003). Применение ДНК-инсектицидов, которые будут неспецифически улучшать биологические показатели культивируемых растений, является перспективным направлением исследований.

Дополнительно в группах эксперимента с листьями картофеля было проанализировано содержание фосфора и магния как одних из основных макроэлементов, участвующих в фотосинтезе и процессах запасания энергии (Таблица 7.6). Достоверности различий содержания данных макроэлементов по сравнению с контролем в группах, обработанных олигонуклеотидами, обнаружено не было. Известно, что недостаток фосфора (Frydenvang et al., 2015)

приводит к задержке развития растения, а недостаток магния к хлорозам (Tanoi, 2015). В ходе проведенного исследования таких видимых изменений выявлено не было, что согласуется с данными по применению ДНК-инсектицидов на деревьях осины в природе (подраздел 3.1).

Таблица 7.6 – Содержание кальция и магния в листьях картофеля на 14-е сутки после обработки ДНК-олигонуклеотидами в концентрации 5 пмоль/см<sup>2</sup>

	контроль	oligoA	oligoRING
магний (ммоль/л)	2,01 ± 0,17	2,12 ± 0,17	2,21 ± 0,21
фосфор (ммоль/л)	2,08 ± 0,36	2,03 ± 0,41	1,98 ± 0,27

Примечание: эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 15-20 листьев для одной повторности каждого варианта эксперимента

Было продемонстрировано успешное управление синтезом вторичных метаболитов растениями на примере снижения уровня образования ментола в мяте перечной *Mentha piperita* L. при помощи антисмыслового oligoMER-11-фрагмента (5'-ACA CTC TTT TG-3'), комплементарного мРНК гена ментонредуктазы, катализирующей превращение ментона в ментол (Рисунок 7.12). Содержание ментола было в 2,03 раза меньше в группе "oligoMER-11" по сравнению с контролем (13,12 ± 1,64% против 6,47 ± 1,04% соответственно). Обнаруженное снижение содержания ментола сопровождалось достоверным повышением содержания ментона по сравнению с контролем (61,2 ± 1,31% против 53,5 ± 1,74% соответственно). Контрольный oligoYM-11-фрагмент (5'-ACA CTC TTT TG-3') не оказал аналогичного действия на растение. В каждой группе эксперимента было получено одинаковое количество эфирного масла, которое находилось в пределах 0,5 ± 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 растениями могут быть добавлены к формуле ДНК-инсектицидов, а также применяться самостоятельно.

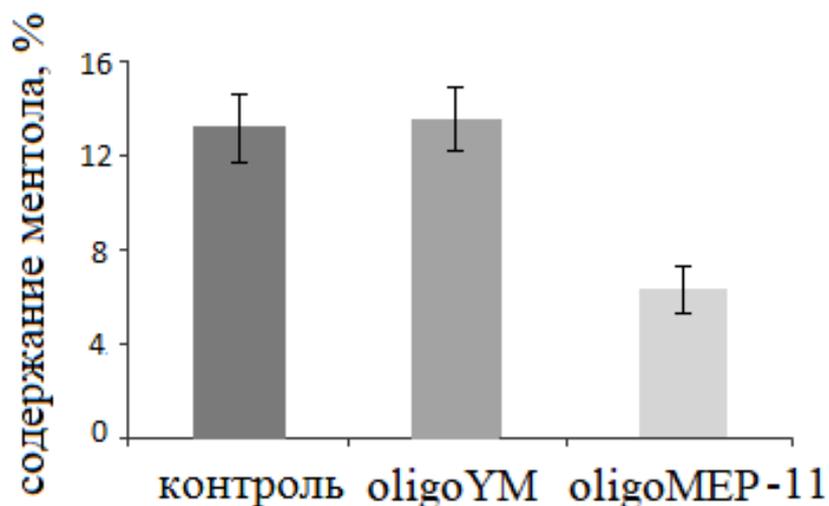


Рисунок 7.12 – Содержание ментола (в %) в масле листьев мяты перечной, контактно обработанных ДНК-олигонуклеотидами в концентрации 50 пмоль/см<sup>2</sup>.

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'-СТС СAG АТТ ССС ААС АСС-3' антиапоптозного IAP-2-гена *Bos taurus taurus* (oligoIAP-2-фрагмент) в концентрации 1 фемтомоль/клетку вызвал достоверное увеличение доли погибших клеток на 12 сутки после трансфекции,  $5,92 \pm 0,18\%$  в группе "oligoIAP-2" против  $1,39 \pm 0,09\%$  в контроле ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 7.13). Напротив, контрольный

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

При помощи программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) было установлено, что, помимо последовательности целевого антиапоптозного IAP-3-гена ВЯП НШ, oligoRING-фрагмент (5'-CGA CGT GGT GGC ACG GCG-3') на данный момент является совершенно комплементарным генным последовательностям 3-х видов организмов: глутамат-1-полуальдегид-2,1-аминомутазы грамотрицательной бактерии *Variovorax sp.* HW608, геликазы грамположительной *Rhodococcus erythropolis* R13 и тирозин N-монооксигеназы риса посевного *Oryza sativa japonica*. При этом не найдено ни одного (!) совпадения с антиапоптозными генами бакуловирусов и их насекомых-хозяев, которые в изобилии представлены в GenBank. Таким образом, антисмысловой ДНК-фрагмент длиной 18 нуклеотидов специфичен и может представлять серьёзную опасность только для очень узкого круга нецелевых организмов. Среди современных химических инсектицидов отсутствуют препараты, обладающие таким высоким уровнем избирательности, однако их создание безусловно необходимо для безопасного ведения сельского и лесного хозяйств.

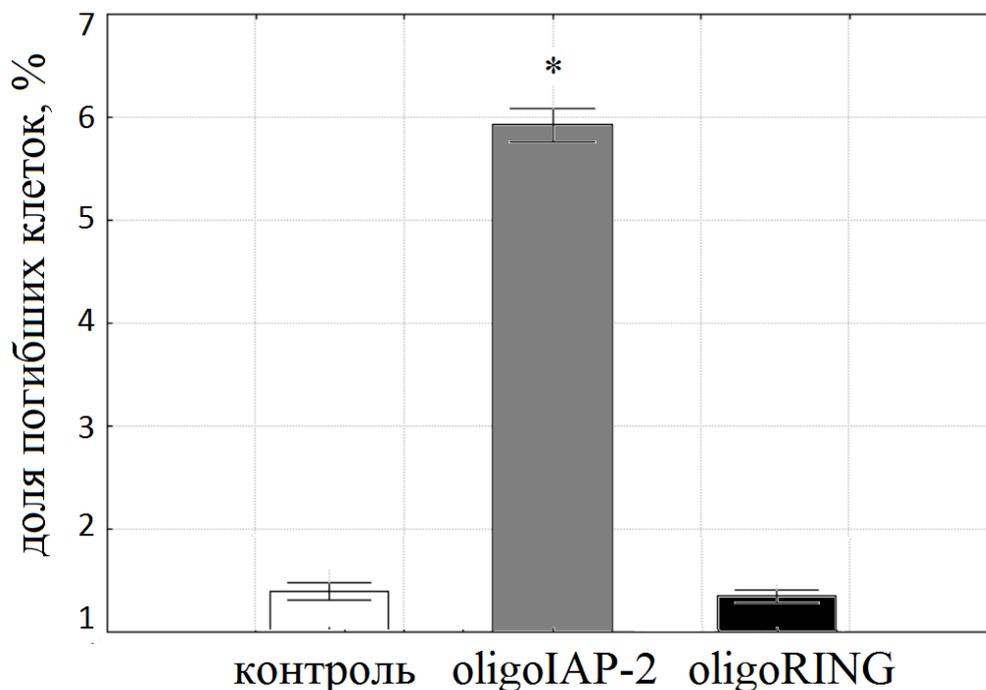


Рисунок 7.13 – Доля погибших стволовых клеток быка домашнего на 12-е сутки после трансфекции с oligoIAP-2-фрагментом и oligoRING-фрагментом. Окрашивание проводили реактивом Хёкста 33342 (все клетки) против иодида пропидия (погибшие клетки). Регистрацию сигналов осуществляли в клеточном сортере Sony SH800 Z (Sony Biotechnology Inc., Япония). Достоверное увеличение доли погибших клеток в группе "oligoIAP-2" обозначено \* при  $p < 0,01$ .

Эксперимент был проведён в 3-х повторностях

Данная работа посвящена одному из фундаментальных и современных вопросов, находящемуся на пересечении популяционной экологии и защиты окружающей среды, – разработка и применение безопасных инсектицидов. С помощью методов экологии, генетики, биохимии, гистологии, органической и аналитической химии были комплексно исследованы биологические эффекты действия антисмысловых олигонуклеотидов в качестве ДНК-инсектицидов с высоким уровнем экологичности на целевых и нецелевых организмах. Необходимость применения инсектицидов не подвергается сомнению, однако многие из них наносят огромный вред окружающей среде, что подталкивает к поиску и применению безопасных препаратов. При этом в сельском и лесном хозяйствах нужно постоянно применять инсектициды, меняя их каждые несколько лет, чтобы избежать возникновения устойчивости к препаратам (химическим или биологическим) со стороны насекомого-вредителя.

В связи с вышеуказанным, перспективными являются разработки препаратов на основе природных полимеров – нуклеиновых кислот: ДНК-инсектицидов (Oberemok et al., 2018) и РНК-препаратов (Gu, 2013). Результаты данной диссертационной работы показывают, что ДНК-инсектициды на основе коротких антисмысловых фрагментов консервативных участков антиапоптозных генов бакуловирусов и их хозяев, а также генов, кодирующих рРНК, являются эффективными и одновременно избирательными препаратами для контроля численности чешуекрылых насекомых на стадии личинки.

Показана безопасность ДНК-инсектицидов для стволовых клеток быка домашнего, нецелевых насекомых (каролинский бражник, совка-ипсилон, шелкопряд-монашенка, амбарный долгоносик, самшитовая огнёвка, колорадский жук) и растений (дуб черешчатый, яблоня домашняя, картофель, пшеница мягкая). Применение oligoRING-инсектицида вслед за бакуловирусным препаратом ВЯП НШ повышает эффективность последнего. 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 целевых насекомых. Мутации в консервативном участке гена возникают реже, поэтому и реже будет изменяться целевой участок мРНК, с которым комплементарно взаимодействует антисмысловый олигонуклеотид. Инсектицидное действие oligoRING-фрагмента основывается на активизации апоптотических процессов, а oligoRIBO-11-фрагмента – на блокировке процессов биосинтеза белка, которые запускаются в ответ на комплементарное взаимодействие с целевой РНК-мишенью. В случае oligoRING-фрагмента снижается экспрессия целевого гена, конденсируется и фрагментируется ядерный материал, уменьшается объём клеток, снижается биомасса гусениц. В результате гибели большого количества клеток насекомое погибает. В случае oligoRIBO-11-фрагмента гибель насекомого наблюдается в результате дистрофии, вызванной обширным блокированием синтеза белка.

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 доступности ДНК-инсектицидов. Была проведена оценка технико-экономической эффективности внедрения разработанных ДНК-инсектицидов. Применение ДНК-инсектицидов, например, oligoRING-инсектицида, является сегодня экономически целесообразным. Проводя исследования на лабораторном ДНК-синтезаторе было подсчитано, что синтез oligoRING-фрагмента может обходиться около 1,1-1,5 рубля за мг, что в цене существенно уступает димилину – часто используемому для контроля численности шелкопрядов препарату (Perry et al., 1997), неизбирательно блокирующему синтез хитина у членистоногих. Цена 1 мг димилина составляет около 0,02-0,03 рубля за мг. Однако, если учесть меньшие нормы расхода на 1 га, то цена количества ДНК-инсектицида, необходимого для обработки (3-4 г/га), будет сравнимой с димилином (10-100 г/га). Дерево дуба или осины высотой 2-3 метра может быть обработано 6-7 мг ДНК-инсектицида. Синтез такого количества ДНК-фрагмента стоит около 7-10 российских рублей. Следовательно, 3-4 г ДНК-инсектицида будет достаточно, чтобы обработать более 500 деревьев высотой 2-3 метра, произрастающих на 1 га леса.

На сегодняшний день остро требуются эффективные препараты для контроля численности непарного шелкопряда в Хабаровском крае, Алтайском крае, Тюменской области, Курганской области и других регионах Российской Федерации. Общий объём средств, необходимый для регуляции численности непарного шелкопряда, по оценкам, сделанным через ресурсы в открытой печати и Интернете, позволяют говорить о сумме, превышающей 1 миллиард рублей. При этом в сотни раз больше будет сумма ущерба от неконтролируемого роста численности непарного шелкопряда, в частности, для лесозаготовительных предприятий. Нужны доступные, безопасные и эффективные препараты, которые обеспечат надёжную защиту леса от непарного шелкопряда. Данная поисковая работа делает первый шаг в направлении создания такого препарата на основе антисмысловых фрагментов – ДНК-инсектицидов (Рисунок 7.14).



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. 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 дезоксирибонуклеазы (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 7.15).

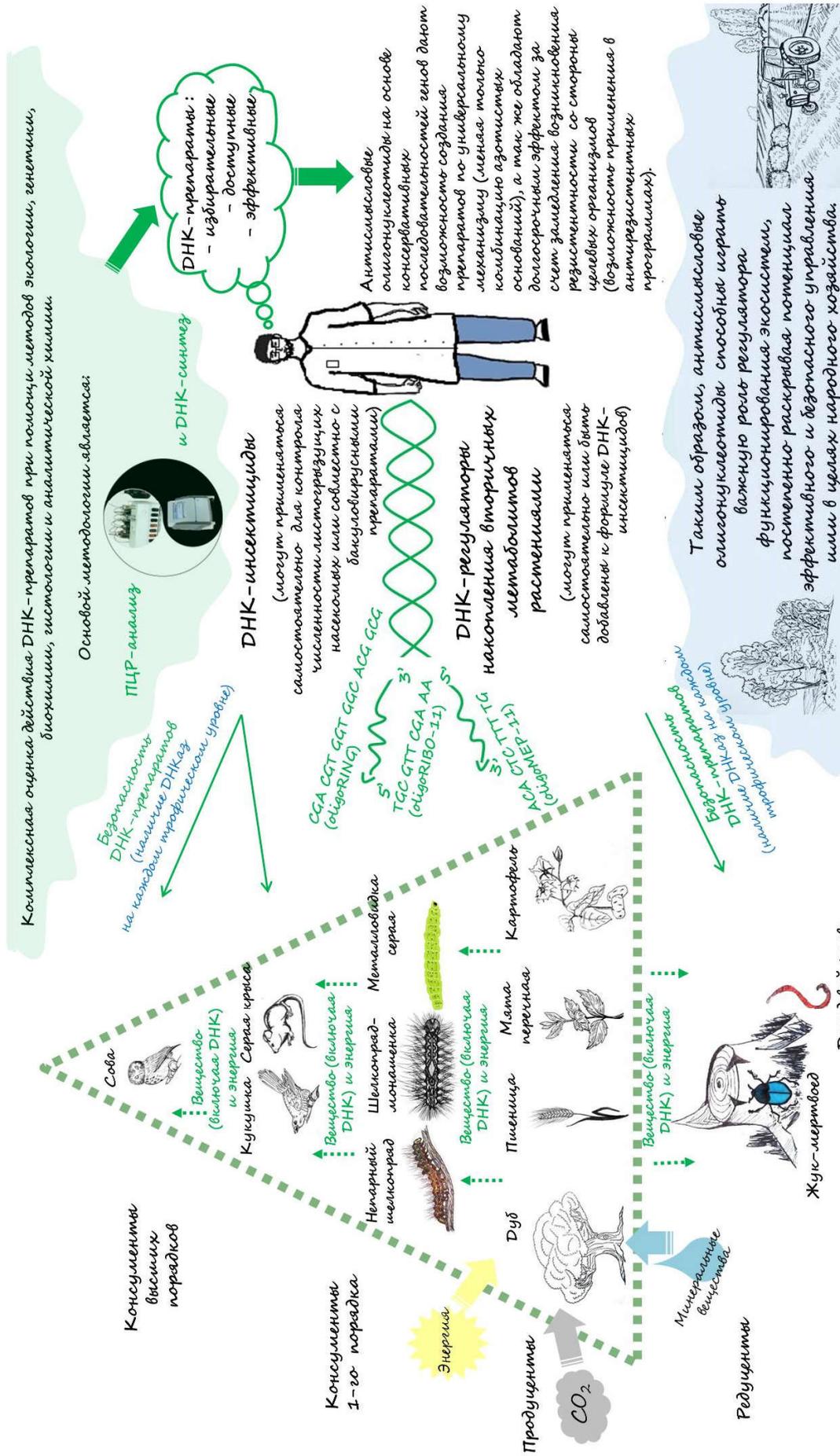


Рисунок 7.15 – Концепция, отображающая экологичность ДНК-препаратов на основе немодифицированных антисмысловых олигонуклеотидов и их перспективу применения в народном хозяйстве

Таким образом, на сегодняшний день 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.

Контактные ДНК-инсектициды, протестированные впервые в серии экспериментов в 2008 г., показали определённую перспективу развития данного постгеномного подхода в сельском и лесном хозяйствах. 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 биоприлипателя "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/см<sup>2</sup> 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.

Перед началом обработки необходимо оценить личиночный возраст непарного шелкопряда, погодные условия, соблюдение мер безопасности и приступать к лесозащитным мероприятиям только в том случае, если они соответствуют описанным выше требованиям.

**СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ**

5,8S рРНК – 5,8S рибосомальная РНК

BIR (Baculoviral IAP Repeat) – бакуловирусный антиапоптозный повтор

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) – инструмент поиска по локальному сравнению оснований

сгу – кристаллический

df – степень свободы

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) – высокоэффективная жидкостная хроматография

IAP-гены – гены-ингибиторы апоптоза

ICTVdb (International Committee on Taxonomy of Viruses Database) – база данных Международного комитета по таксономии вирусов

N – объем выборки

p – уровень значимости

RING (Really Interesting New Gene) – по-настоящему интересный новый ген

Sxl (sex lethal) gene – половой летальный ген

$\chi^2$  – тест на гомогенность частот между выборками контрольных и опытных вариантов

ВЯП МС – вирус ядерного полиэдроза металловидки серой

ВЯП НШ – вирус ядерного полиэдроза непарного шелкопряда

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ДМЕМ (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) – питательная среда Игла, модифицированная Дюльбекко

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дц – двухцепочечный

кДа – килодальтон

ЛД<sub>50</sub> – летальная доза, необходимая для гибели 50% испытуемых организмов

мРНК – матричная РНК

нт – нуклеотид

ОТ-ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени

оц – одноцепочечный

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рН – водородный показатель

РНК – рибонуклеиновая кислота

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abou-Elela, S. Role of the 5.8S rRNA in ribosome translocation / S. Abou-Elela, N.R. Nazar // *Nucleic Acids Research*. – 1997. – Vol. 25. – P. 1788-1794.
2. Aker, W.G. Comparing the relative toxicity of malathion and malaoxon in blue catfish *Ictalurus furcatus* / W. G. Aker, X. Hu, P. Wang, H.M. Hwang // *Environ. Toxicol.* – 2008. – Vol. 23. – P. 548-554.
3. Aktar, W. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards / W. Aktar, D. Sengupta, A. Chowdhury // *Interdisc. Toxicol.* – 2009. – Vol. 2 (1). – P. 1-12.
4. Alalouni, U. Natural enemies and environmental factors affecting the population dynamics of the gypsy moth. / U. Alalouni, M. Schädler, R. Brandl // *J. Appl. Entomol.* – 2013. – Vol. 137. – P. 721-738.
5. Alberts, B. *Molecular biology of the cell*, 4th edition. Chapter 6: From DNA to RNA / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walte – New York: Garland Science, 2002.
6. Alyokhin, A. Colorado potato beetle management on potatoes: current challenges and future prospects / A. Alyokhin // *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*. – 2009. – Vol. 3 (1). – P. 10-19.
7. Angus, T.A. Bacterial toxin paralyzing silkworm larvae / T.A. Angus. // *Nature*. – 1954. – Vol. 173. – P. 545.
8. Araujo, R.N. RNA interference of the salivary gland Nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (*Hemiptera: Reduviidae*) by dsRNA ingestion or injection. / R.N. Araujo, A. Santos, F.S. Pinto, N.F. Gontijo, M.J. Lehane, M.H. Pereira // *Insect Biochem. Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 36. – P. 683–693.
9. Asser-Kaiser, S. Sex linkage of CpGV resistance a heterogeneous field strain of the codling moth *Cydia pomonella* (L.) / S. Asser-Kaiser, D.G. Heckel, J.A. Jehle. // *J. of Invertebrate Pathology*. – 2010. – Vol. 103. – P. 59-64.

10. Atinmo, T. Breaking the poverty/malnutrition cycle in Africa and the Middle East / T. Atinmo, P. Mirmiran, O.E. Oyewole, R. Belahsen, L. Serra-Majem // *Nutr. Rev.* – 2009. – Vol. 67. – P. 40-46.
11. Bale, J.S. Biological control and sustainable food production / J.S. Bale, J.C. van Lenteren, F. Bigler // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* – 2008. – Vol. 363. – P. 761-776.
12. Bate, R. The rise, fall, rise, and imminent fall of DDT / R. Bate // *American Enterprise Institute for Public Policy Research.* – 2007. – Vol. 14 (4). – P. 1-9.
13. Belles, X. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects / X. Belles // *Ann. Rev. Entomol.* – 2010. – Vol. 55. – P. 111-128.
14. Bergmann, A. The role of ubiquitylation for the control of cell death in *Drosophila* / A. Bergmann // *Cell Death Differ.* – 2010. – Vol. 17. – P. 61-67.
15. Bertin, J. Apoptotic suppression by baculovirus P35 involves cleavage by and inhibition of a virus induced CED-3 ICE-like protease / J. Bertin, S.M. Mendrysa, D.J. LaCount, S. Gaur, J.F. Krebs, R.C. Armstrong, K.J. Tomaselli, P.D. Friesen // *J. Virology.* – 1996. – Vol. 70 (9). – P. 6251-6259.
16. Bhuiyan, N.H. Organochlorine insecticides (DDT and heptachlor) in dry fish available in Bangladesh: seasonal trends and species variability / N.H. Bhuiyan, Habiburrahmanbhuiyan, K.K. Nath, K. Ahmed, T. Hassan, N.I. Bhuiyan // *J. Chil. Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 54. – P. 278-281.
17. Bischoff, D.S. Molecular analysis of an enhancing gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus / D.S. Bischoff, J.M. Slavicek // *J. Virology.* – 1997. – Vol. 71. – P. 1097-1106.
18. Blacquièrè, T. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment / T. Blacquièrè, G. Smagghe, C.A. van Gestel, V. Mommaerts // *Ecotoxicology.* – 2012. – Vol. 21. – P. 973-992.
19. Bonmatin, J.M. Behavior of imidacloprid in fields. Toxicity for honey bees / J.M. Bonmatin, I. Moineau, R. Charvet // *Env. Chem.* – 2005. – Vol. 44. – P. 483-494.
20. Braasch, D.A. Locked nucleic acid (LNA): Fine-tuning the recognition of DNA and RNA / D.A. Braasch, D.R. Corey // *Chem. Biol.* – 2001. – Vol. 8. – P. 1-7

21. Broughton, E. The Bhopal disaster and its aftermath: a review / E. Broughton // *Environmental Health*. – 2005. – Vol. 4 (6).
22. Buratti, F.M. Malathion bioactivation in the human liver: The contribution of different cytochrome P450 isoforms / F.M. Buratti, A. D'Aniello, M.T. Volpe, A. Meneguz, E. Testai // *Drug Metab. Dispos.* – 2005. – Vol. 33. – P. 295-302.
23. Cai, Y.H. Advances in the study of protein-DNA interaction / Y.H. Cai, H. Huang // *Amino Acids*. – 2012. – Vol. 43. – P. 1141-1146.
24. Cappaert, D.L. Incidence of natural enemies of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) on a native host in Mexico / D.L. Cappaert, F.A. Drummond, P.A. Logan // *Entomophaga*. – 1991. – Vol. 36. – P. 369-378.
25. Carmell, M.A. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing / M.A. Carmell, G.J. Hannon // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2004. – Vol. 11 (3). – P. 214-218.
26. Carpenter, M. Hydrolysis of <sup>14</sup>C-carbaryl in aqueous solutions buffered at pH 5, 7 and 9 / M. Carpenter // Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA. – 1990. – Vol. 169-218: 92535.
27. Carriger, J.F. Pesticides of potential ecological concern in sediment from South Florida canals: an ecological risk prioritization for aquatic arthropods / J.F. Carriger, G.M. Rand, P.R. Gardinali, W.B. Perry, M.S. Tompkins, A.M. Fernandez // *Soil and Sediment Contamination*. – 2006. – Vol. 15. – P. 21-45.
28. Casida, J.E. Anticholinesterase insecticide retrospective / J.E. Casida, K.A. Durkin // *Chemico-Biological Interactions*. – 2013. – Vol. 203 (1). – P. 221-225.
29. Cech, T.R. RNA as an enzyme / T.R. Cech // *Scientific American*. – 1986. – Vol. 255. – P. 64-75.
30. Cerio, R.J. Host insect inhibitor-of-apoptosis SfiAP functionally replaces baculovirus IAP but is differentially regulated by its N-terminal leader / R.J. Cerio, R. Vandergaast, P.D. Friesen // *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84. – P. 11448-11460.

31. Chauhan, S.S. Effect of imidacloprid insecticide residue on biochemical parameters in potatoes and its estimation by HPLC / S.S. Chauhan, S. Agrawal, A. Srivastava // *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2013. – Vol. 6. – P. 114-117.
32. Chen, F. Genetic characterization of the gypsy moth from China (*Lepidoptera, Lymantriidae*) using inter simple sequence repeats markers / F. Chen, J. Shi, Y.Q. Luo, S.Y. Sun, M. Pu // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – e73017.
33. Chedi, B.A. Effect and management of acute dichlorvos poisoning in wistar rats / B.A. Chedi, M. Aliyu // *Bayero J. of Pure and Appl. Sc.* – 2010. – Vol. 3(2). – P. 1-3.
34. Chiu, E. Insect virus polyhedra, infectious protein crystals that contain virus particles / E. Chiu, F. Coulibaly, P. Metcalf // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2012. – Vol. 22. – P. 234-240.
35. Chow, J.K. The effects of larval experience with a complex plant latex on subsequent feeding and oviposition by the cabbage looper moth: *Trichoplusia ni* (*Lepidoptera: Noctuidae*) / J.K. Chow, Y. Akhtar, M. B. Isman // *Chemoecology*. – 2005. – Vol. 15 (3). – P. 129-133.
36. Clarke, T.E. Insect defenses against virus infection: the role of apoptosis / T.E. Clarke, R.J. Clem. // *Int. Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 22. – P. 401-424.
37. Clarke, B.S. The inhibition of chitin synthesis in *Spodoptera littoralis* larvae by flufenoxuron, teflubenzuron and diflubenzuron / B.S. Clarke, P.J. Jewess // *Pestic. Sci.* – 1990. – Vol. 28. – P. 377–388.
38. Clem, R.J. Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly / R.J. Clem // *Cell Death Differ.* – 2001. – Vol. 8. – P. 137-143.
39. Clem, R.J. Baculoviruses: Sophisticated Pathogens of Insects / R.J. Clem, L.A. Passarelli // *PLoS Pathol.* – 2013.
40. Clem, R.J. The role of apoptosis in defense against baculovirus infection in insects / R.J. Clem, D. Griffin // *Role of apoptosis in infection*. – Springer, Berlin, 2005. – P. 113–129.
41. Coulibaly, F. The atomic structure of baculovirus polyhedra reveals the independent emergence of infectious crystals in DNA and RNA viruses / F. Coulibaly,

E. Chiu, S. Gutmann, C. Rajendran, P.W. Haebel, K. Ikeda, H. Mori, V.K. Ward, C. Schulze-Briese, P. Metcalf // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 106. – P. 22205-22210.

42. Daly, H. *Introduction to insect biology and diversity*/ Oxford University Press / H. Daly, J.T. Doyen, A.H. Purcell. – New York, NY, 1998. – 696 p.

43. Davies, T.G. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels / T.G. Davies, L.M. Field, P.N. Usherwood, M.S. Williamson // *IUBMB Life*.– 2007. – Vol. 59 (3). – P. 151-162.

44. de Diesbach, P. Identification, purification and partial characterization of an oligonucleotide receptor in membranes of HepG2 cells / P. de Diesbach, C. Berens, F. N’Kuli, M. Monsigny, E. Sonveaux, R.Wattiez, P.J. Courtoy // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – Vol. 28. – P. 868-874.

45. de Maagd, R.A. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world / R.A. de Maagd, A. Bravo, N. Crickmore // *Trends in Genetics*. – 2001. – Vol. 17. – P. 193-199.

46. Deivendran, A. Dissipation of endosulfan and dichlorvos residues in/on cauliflower curds / A. Deivendran, B. Kumari, G. Yadav // *Environmental Monitoring and Assessment*. – 2006. – Vol. 116. – P. 307-313.

47. Dekkers, B.J. Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana* / B.J. Dekkers, J.A. Schuurmans, S.C. Smeekens // *Planta*. – 2004. – Vol. 218. – P. 579-588.

48. Dhaliwal, G.S. Biodiversity and ecological agriculture: Issues and perspectives / G.S. Dhaliwal, A.K. Dhawan, R. Singh // *Indian J. Ecol.* – 2007. – Vol. 34 (2). – P. 100-109.

49. Diamond, J.B. Long-term residue of DDT compounds in forest soils in Maine / J.B. Diamond, R.B. Owen // *Env. Pollut.* – 1996. – Vol. 92 (2). – P. 227-230.

50. Dias, N. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms / N. Dias, C.A. Stein // *Mol. Cancer Ther.* – 2002. – Vol. 1. – P. 347-355.

51. Donis-Keller, H. Site specific enzymatic cleavage of RNA / H. Donis-Keller // *Nucleic Acids Res.* – 1979. – Vol. 7. – P. 179–192.

52. Duan, L. Comparison of the activities of three LdMNPV isolates in the laboratory against the Chinese strain of Asian gypsy moth / L. Duan, I.S. Otvos, L.B. Xu, N. Conder, Y. Wang // *Open Entomol. J.* – 2011. – Vol. 5. – P. 24-30.
53. Duckett, C.S. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus IAP gene and encoding apoptosis inhibitors / C.S. Duckett, V.E. Nava, R.W. Gedrich, R.J. Clem, J.L. van Dongen, M.C. Gilfillan, H. Shiels, J.M. Hardwick, C.B. Thompson // *EMBO J.* – 1996. – Vol. 15 (11). – P. 2685-2694.
54. Duff, S.M. The role of acid phosphatase in plant phosphorus metabolism / S.M. Duff, G. Sarath, W.C. Plaxton // *Physiology Plant.* – 1994. – Vol. 90. – P. 791-800.
55. Ebling, P.M. Comparative activity of three isolates of LdMNPV against two strains of *Lymantria dispar* / P.M. Ebling, I.S. Otvos, N. Conder // *Canad. Entomol.* – 2004. – Vol. 136 (5). – P. 737-747.
56. Eckstein, F. Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides / F. Eckstein // *Nucleic Acid Therapeutics.* – 2014. – Vol. 24. – P. 374–387.
57. Eddleston, M. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning / M. Eddleston, N.A. Buckley, P. Eyer, A.H Dawson // *Lancet.* – 2008. – Vol. 371. – P. 597-607.
58. Ehsanpour, A.A. Effect of salt and drought stress on acid phosphatase activities in alfalfa (*Medicago sativa* L.) explants under in vitro culture / A.A. Ehsanpour, F. Amini // *African Journal of Biotechnology.* – 2003. – Vol. 2. – P. 133-135.
59. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death / S. Elmore // *Toxicol. Pathol.* – 2007. – Vol. 35 (4). – P. 495-516.
60. Essumang, D.K. Pesticide residues in water and fish (*Lagoon tilapia*) samples from lagoons in Ghana / D.K. Essumang, G.K. Togoh, L. Chokky // *Bull. Chem. Soc. Ethiopia.* – 2009. – Vol. 23. – P. 19-27.
61. Fakoorziba, M.R. Synergist efficacy of piperonyl butoxide with deltamethrin as pyrethroid insecticide on *Culex tritaeniorhynchus* (*Diptera: Culicidae*)

and other mosquito species / M.R. Fakoorziba, F. Eghbal, V.A. Vijayan // *Env. Toxicol.* – 2009. – Vol. 24 (1). – P. 19-24.

62. Federici, B.A. Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control / B.A. Federici, H.W. Park, D.K. Bideshi // *The Open Toxinol. J.* – 2010. – Vol. 3. – P. 83-100.

63. Feller, U. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated / U. Feller, I. Anders, T. Mae // *Journal of Experimental Botany.* – 2008. – Vol. 59. – P. 1615-1624.

64. Fiedler, H. The handbook of environmental chemistry / H. Fiedler // *Persistent organic pollutants.* – 2003. – Vol. 3. – P. 47-90.

65. Fire, A. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* / A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello // *Nature.* – 1998. – Vol. 391. – P. 806-811.

66. Frydenvang, J. Sensitive detection of phosphorus deficiency in plants using chlorophyll a fluorescence / J. Frydenvang, M. van Maarschalkerweerd, A. Carstensen, S. Mundus, S.B. Schmidt, P.R. Pedas, K.H. Laursen, J.K. Schjoerring, S. Husted // *Plant Physiol.* – 2015. – Vol. 169. – P. 353-361.

67. Fukuto, T.R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides / T.R. Fukuto // *Environ. Health Perspect.* – 1990. – Vol. 87. – P. 245-254.

68. Gan, Q. Degradation of naled and dichlorvos promoted by reduced sulfur species in well-defined anoxic aqueous solutions / Q. Gan, R.M. Singh, U. Jans // *Environmental Science & Technology.* – 2006. – Vol. 40(3). – P. 778-783.

69. Ghosh, A. Plant extracts as potential mosquito larvicides / A. Ghosh, N. Chowdhury, G. Chandra // *The Indian J. Medical Research.* – 2012. – Vol. 135. – P. 581-598.

70. Girolami, V. Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seed to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees / V. Girolami, L. Mazzon, A. Squartini, N. Mori, M. Marzaro, A. Di Bernardo, M. Greatti, C. Giorio, A. Tapparo // *J. Econ. Entomol.* – 2009. – Vol. 102 (5). – P. 1808-1815.

71. Goulson, D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides / D. Goulson // *Journal of Applied Ecology*. – 2013. – Vol. 50. – P. 977-987.
72. Gourley, S.A. Slowing the evolution of insecticide resistance in mosquitoes: a mathematical model / S.A. Gourley, R. Liu, J. Wu // *Proc. R. Soc. A*. – 2011. – Vol. 467. – P. 21-27.
73. Graifer, D. The central part of the 5.8 S rRNA is differently arranged in programmed and free human ribosomes / D. Graifer, M. Molotkov, A. Eremina, A. Ven'yaminova, M. Repkova, G. Karpova // *Biochemical Journal*. – 2005. – Vol. 387. – P. 139-145.
74. Grayson, K.L. Performance of wild and laboratory-reared gypsy moth (*Lepidoptera: Erebidae*): A comparison between foliage and artificial diet / K.L. Grayson, D. Parry, T.M. Faske, A. Hamilton, P.C. Tobin, S.J. Agosta, D.M. Johnson // *Environ. Entomol.* – 2015. – Vol. 44. – P. 864-873.
75. Grunweller, A. Locked nucleic acid oligonucleotides: The next generation of antisense agents? / A. Grunweller, R.K. Hartmann // *BioDrugs*. – 2007. – Vol. 21. – P. 235–243.
76. Gu, L. Recent advances in RNA interference research in insects: implications for future insect pest management strategies / L. Gu, D.C. Knipple // *Crop Protection*. – 2013. – Vol. 45. – P. 36-40.
77. Gulati, J.K. Child malnutrition: trends and issues Kamla-Raj / J.K. Gulati // *Anthropologist*. – 2010. – Vol. 12 (2). – P. 131140.
78. Habiba, R.A. Biochemical effects of profenofos residues in potatoes / R.A. Habiba, H.M. Ali, S.M. Ismail // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1992. – Vol. 40 (10). – P. 1852-1855.
79. Hamshou, M. High entomotoxicity and mechanism of the fungal GalNAc/Gal-specific *Rhizoctonia solani* lectin in pest insects / M. Hamshou, E.J. Van Damme, S. Caccia, K. Cappelle, G. Vandenborre, B. Ghesquière, K. Gevaert, G. Smaghe // *Insect Physiol.* – 2013. – Vol. 59. – P. 295-305.

80. Harner, T. Residues of organochlorine pesticides in Alabama soils / T. Harner, J.L. Wideman, L.M. Jantunen, T.F. Bidleman, W.J. Parkhurst // *Environ. Pollut.* – 1999. – Vol. 106. – P. 323-332.
81. Hay, B.A. The genetics of cell death: approaches, insights and opportunities in *Drosophila* / B.A. Hay, J.R. Huh, M. Guo // *Nat. Rev. Genet.* – 2004. – Vol. 5 (12). – P. 911-922.
82. Hemingway, J. Insecticide resistance in insect vectors of human disease / J. Hemingway, H. Ranson // *Annual Rev. Entomol.* – 2000. – Vol. 45. – P. 371-391.
83. Herniou, E.A. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts / E.A. Herniou, J.A. Olszewski, D.R. O'Reilly, J.S. Cory // *J. Virology.* – 2004. – Vol. 78. – P. 3244-3251.
84. Hoover, K. A gene for an extended phenotype / K. Hoover, M. Grove, M. Gardner, D.P. Hughes, J. McNeil, J. Slavicek // *Science.* – 2011. – Vol. 333.
85. Hu, G. Concentrations and accumulation features of organochlorine pesticides in the Baiyangdian lake freshwater food web of North China / G. Hu, J. Dai, B. Mai, X. Luo, H. Cao, J. Wang, F. Li, M. Xu // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* – 2010. – Vol. 58. – P. 700-710.
86. Hughes, A.L. Evolution of inhibitors of apoptosis in baculoviruses and their insect hosts / A.L. Hughes // *Infection, Genetics and Evolution.* – 2002. – Vol. 2. – P. 3-10.
87. Huh, J.R. The *Drosophila* inhibitor of apoptosis (IAP) DIAP2 is dispensable for cell survival, required for the innate immune response to gram-negative bacterial infection, and can be negatively regulated by the reaper/hid/grim family of IAP-binding apoptosis inducers / J.R. Huh, I. Foe, I. Muro, C.H. Chen, J.H. Seol, S.J. Yoo, M. Guo, J.M. Park, B.A. Hay // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282 (3). – P. 2056-68.
88. Hunt, J. The potential impact of reducing global malnutrition on poverty reduction and economic development / J. Hunt // *Asia Pacific J. of Clinic. Nutrition.* – 2005. – Vol. 14. – P. 10-38.

89. Huvenne, H. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review / H. Huvenne, G. Smagghe // *J. Insect Physiology*. – 2010. – Vol. 56. – P. 227-235.
90. Ignatowicz, S. Potential of common herbs as grain protectants: repellent effect of herb extracts on the granary weevil, *Sitophilus granarius* (L). In: Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-Product Protection / S. Ignatowicz, B. Wesolowska // Canberra, Australia. – 1994. – P. 790-794.
91. Ikeda, M. Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells / M. Ikeda, H. Yamada, R. Hamajima, M. Kobayashi // *J. Virology*. – 2013. – Vol. 435. – P. 1-13.
92. Ikeda, M. Baculovirus IAP1 induces caspase-dependent apoptosis in insect cells / M. Ikeda, H. Yamada, H. Ito // *J. General Virology*. – 2011. – Vol. 9 (2). – P. 2654-2663.
93. Inceoglu, A. B. Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook / A.B. Inceoglu, S.G. Kamita, B.D. Hammock // *Adv. Virus Res.* – 2006. – Vol. 68. – P. 322-327.
94. Ishikawa, H. Kobayashi M. Induction of apoptosis in an insect cell line, IPLB-Ld652Y, infected with nucleopolyhedroviruses / H. Ishikawa, M. Ikeda, K. Yanagimoto, C.A. Alves, Y. Katou, B.A. Laviña-Caoili, M. Kobayashi. // *J. Gen. Virol.* – 2003. – Vol. 84. – P. 705-714.
95. Isman, M.B. The role of botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world / M.B. Isman // *Annual Review of Entomology*. – 2006. – Vol. 51. – P. 45-66.
96. Jayachandran, B. RNA interference as a cellular defense mechanism against the DNA virus baculovirus / B. Jayachandran, M. Hussain, S. Asgari // *J. Virology*. – 2012. – Vol. 86. – P. 13729-13734.
97. Jehle, J.A. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision / J.A. Jehle, G.W. Blissard, B.C. Bonning, J.S. Cory, E.A. Herniou, G.F. Rohrmann, D.A. Theilmann, S.M. Thiem, J.M. Vlak // *Archives of Virology*. – 2006. – Vol. 151 (7). – P. 1257-1266.

98. Jeschke, P. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids / P. Jeschke, R. Nauen, M. Schindler, A. Elbert // *J. Agric. Food Chem.* – 2011. – Vol. 59. – P. 2897-2908.
99. Kalia, V. Optimization of production of nucleopolyhedrovirus of *Helicoverpa armigera* throughout larval stages / V. Kalia, S. Chaudhari, G. J. Gujar // *Phytoparasitica.* – 2001. – Vol. 29 (1). – P. 23-28.
100. Karunaratne, S.H. Insecticide resistance in insects: a review / S.H. Karunaratne // *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences).* – 1998. – Vol. 25. – P. 72-99.
101. Katsuma, S. The baculovirus uses a captured host phosphatase to induce enhanced locomotory activity in host caterpillars / S. Katsuma, Y. Koyano, WK. Kang, R. Kokusho, S.G. Kamita, T. Shimada // *PLoS Pathog.* – 2012. – Vol. 8 (4).
102. Kawanishi, C.Y. Entry of an Insect virus in vivo by fusion of viral envelope and microvillus membrane / C.Y. Kawanishi, M.D. Summers, D.B. Stoltz, H.J. Arnott // *J. Invert. Pathol.* – 1972. – Vol. 20 (1). – P. 104-108.
103. Kidd, H. The agrochemicals handbook, Third Edition / H. Kidd, D. R. James. – Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry Information Services, 1991. – P. 2-13.
104. Koella, J.C. Towards evolution-proof malaria control with insecticides / J. C. Koella, P.A. Lynch, M.B. Thomas, A.F. Read // *Evolutionary Applications.* – 2009. – Vol. 2. – P. 469-480.
105. Kost, T.A. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells / T.A. Kost, J.P. Condreay, D.L. Jarvis // *Nature Biotechnology.* – 2005. – Vol. 23. – P. 567-575.
106. Krupke, C.H. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields / C.H. Krupke, G.J. Hunt, B.D. Eitzer, G. Andino, K. Given // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 7.
107. Kuzio, J. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar* / J. Kuzio, M.N. Pearson, S.H. Harwood, C.J. Funk, J.T. Evans, J.M. Slavicek, G.F. Rohrmann // *J. Virology.* – 1999. – Vol. 253. – P. 17-34.

108. Laskowski, D.A. Physical and chemical properties of pyrethroids / D.A. Laskowski // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* – 2002. – Vol. 174. – P. 49-170.
109. Leulier, F. The *Drosophila* inhibitor of apoptosis protein DIAP2 functions in innate immunity and is essential to resist gram-negative bacterial infection / F. Leulier, N. Lhocine, B. Lemaitre, P. Meier // *Mol. Cell. Biol.* – 2006. – Vol. 26. – P. 7821-7831.
110. Li, X. RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs / X. Li, M. Zhang, H. Zhang // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6.
111. Liu, Y. Identification of valid housekeeping genes for real-time quantitative PCR analysis of collapsed lung tissues of neonatal somatic cell nuclear transfer-derived cattle / Y. Liu, Y. Zhang, Q. Jiang, M. Rao, Z. Sheng, Y. Zhang, W. Du, H. Hao, X. Zhao, Z. Xu, J. Liu, H. Zhu // *Cell Reprogram.* – 2015. – Vol. 17. – P. 360-367.
112. Lo, A.C. Effects of ribosome dissociation on the structure of the ribosome-associated 5.8S RNA / A.C. Lo, W.Y. Liu, D.E. Culham, R.N. Nazar // *Biochemistry and Cell Biology.* – 1987. – Vol. 65. – P. 536-542.
113. Loke, S.L. Characterization of oligonucleotide transport in to living cells / S.L. Loke, C.A. Stein, X.H. Zhang, K. Mori, M. Nakanishi, C. Subasinghe, J.S. Cohen, L.M. Neckers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol. 86. – P. 3474-3478.
114. Lozowicka, B. Occurrence of pesticide residues in fruit from Podlasie (Poland) in 2012 / B. Lozowicka, I. Hrynko, P. Kaczyński // *J. Plant Protection Res.* – 2015. – Vol. 55 (2). – P. 142-150.
115. Lu, X. Antisense-mediated inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) replication by use of an HIV type 1-based vector results in severely attenuated mutants incapable of developing resistance / X. Lu, Q. Yu, G.K. Binder, Z. Chen, T. Slepushkina, J. Rossi, B. Dropulic // *J. Virology.* – 2004. – Vol. 78. – P. 7079-7088.
116. Lundgren, J.G. RNAi-based insecticidal crops: potential effects on nontarget species / J.G. Lundgren, J.J. Duan // *Bioscience.* – 2013. – Vol. 63. – P. 657-665.

117. Maeda, I. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi / I. Maeda [et al.] // *Current Biology*. – 2001. – Vol. 11. – P. 171-176.
118. Majori, G. Short history of malaria and its eradication in Italy / G. Majori // *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 4 (1). – P. 16.
119. Manji, GA. Baculovirus inhibitor of apoptosis functions at or upstream of the apoptotic suppressor P35 to prevent programmed cell death / G.A. Manji, R.R. Hozak, D.J. LaCount, P.D. Friesen // *J. Virology*. – 1997. – Vol. 71. – P. 4509-4516.
120. Manna, S. Neuropharmacological effects of deltamethrin in rats / S. Manna, D. Bhattacharyya, T.K. Mandal, S. Dey // *Journal of Veterinary Science*. – 2006. – Vol. 7. – P. 133-136.
121. Matassov, D. Measurement of apoptosis by DNA fragmentation / D. Matassov, T. Kagan, J. Leblanc, M. Sikorska, Z. Zakeri // *Methods Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 282. – P. 1-17.
122. Mayr, J. Transfection of Antisense Oligonucleotides Mediated by Cationic Vesicles Based on Non-Ionic Surfactant and Polycations Bearing Quaternary Ammonium Moieties / J. Mayr, S. Grijalvo, J. Bachl, R. Pons, R. Eritja, D. Díaz Díaz // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18. – P. 1139.
123. McManus, M. Gypsy moth. Forest Insect & Disease Leaflet 162 / M. McManus, N. Schneeberger, R. Reardon, G. Mason // *USDA, Forest Service*. – 1989.
124. Mello, C.C. Revealing the world of RNA interference / C.C. Mello, D.J. Conte // *Nature*. – 2004. – Vol. 431. – P. 338-342.
125. Mencke, N. Therapy and prevention of parasitic insects in veterinary medicine using imidacloprid / N. Mencke, P. Jeschke // *Curr. Topics. Medl. Chem.* – 2002. – Vol. 2 (7). – P. 701-715.
126. Metalnikov, S. On the infection of the gypsy moth and certain other insects with *Bacterium thuringiensis* / S. Metalnikov, V. Chlorine // *International Corn Borer Investigations. Scientific Reports*. – 1929. – Vol. 2. – P. 60-61.

127. Metcalf, R.L. Structure-activity relationships for insecticidal carbamates / R.L. Metcalf // Bull. WHO. – 1971. – Vol. 44. – P. 43-78.
128. Miller, L.K. Bacterial viral and fungal insecticides / L.K. Miller, A.J. Lingg, L.A. Bulla // Science. – 1983. – Vol. 219. – P. 715-721.
129. Miller, L.K. Baculovirus interaction with host apoptotic pathways / L.K. Miller // J. Cell Physiol. – 1997. – Vol. 173. – P. 178-182.
130. Mirmiran, P. Iron, iodine and vitamin A in the Middle East: a systematic review of deficiency and food fortification / P. Mirmiran, M. Golzarand, L. Serra-Majem, F. Azizi // Iran J. Public Health. – 2012. – Vol. 41(8). – P. 8-19.
131. Mishra, S. Changes in phosphate content and phosphatase activities in rice seedlings exposed to arsenite / S. Mishra, R.S. Dubey // Brazilian Journal Plant Physiology. – 2008. – Vol. 20. – P. 19-28.
132. Moazami, N. Biopesticides production / N. Moazami // Agriculture and Biology J. of North America. – 2012. – Vol. 3 (7). – P. 271-279.
133. Moscardi, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of *Lepidoptera* / F. Moscardi // The Annual Review of Entomology. – 1999. – Vol. 44. – P. 257-289.
134. Mroczek, S. Apoptotic signals induce specific degradation of ribosomal RNA in yeast / S. Mroczek, J. Kufel // Nucleic Acids Res. – 2008. – Vol. 36. – P. 2874-2888.
135. Msangi, S. Field and laboratory evaluation of bioefficacy of an insect growth regulator (Dimilin) as a larvicide against mosquito and housefly larvae / S. Msangi, E. Lyatuu, E. Kweka // J. Trop. Med. – 2011. – P. 394-541.
136. Nakladal, O. Review of historical outbreaks of the nun moth (*Lymantria monacha*) with respect to host tree species / O. Nakladal, H. Brinkeova // J. For. Sci. – 2015. – Vol. 61 (1). – P. 1826.
137. Nazar, R.N. The eukaryotic 5.8 and 5S ribosomal RNAs and related rDNAs / R.N. Nazar // The Cell Nucleus. – 1982. – Vol. 11. – P. 1-28.

138. Obbard, D.J. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements / D.J. Obbard, K.H. Gordon, A.H. Buck, F.M. Jiggins // *Phil. Trans. R. Soc. B: Biological Sciences*. – 2009. – Vol. 364. – P. 99-115.

139. Oberemok, V.V. A Half-Century History of Applications of Antisense Oligonucleotides in Medicine, Agriculture and Forestry: We Should Continue the Journey / V.V. Oberemok, K.V. Laikova, A.I. Repetskaya, I.M. Kenyo, M.V. Gorlov, I.N. Kasich, A.M. Krasnodubets, N.V. Gal'chinsky, I.I. Fomochkina, A.S. Zaitsev, V.V. Bekirova, E.E. Seidosmanova, K.I. Dydik, A.O. Meshcheryakova, S.A. Nazarov, N.N. Smagliy, E.L. Chelengerova, A.A. Kulanova, K. Deri, M.V. Subbotkin, R.Z. Useinov, M.N. Shumskykh, A.V. Kubyshkin // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23. – P. 1302.

140. Oberemok, V.V. Molecular Alliance of *Lymantria dispar* Multiple Nucleopolyhedrovirus and a Short Unmodified Antisense Oligonucleotide of Its Anti-Apoptotic IAP-3 Gene: A Novel Approach for Gypsy Moth Control / V.V. Oberemok, K.V. Laikova, A.S. Zaitsev, M.N. Shumskykh, I.N. Kasich, N.V. Gal'chinsky, V.V. Bekirova, V.V. Makarov, A.A. Agranovsky, V.A. Gushchin, I.V. Zubarev, A.V. Kubyshkin, I.I. Fomochkina, M.V. Gorlov, O.A. Skorokhod // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18. – P. 2446.

141. Oberemok, V.V. Single-stranded DNA fragments of insect-specific nuclear polyhedrosis virus act as selective DNA insecticides for gypsy moth control / V.V. Oberemok, O.A. Skorokhod // *Pestic. Biochem. Physiol.* – 2014. – Vol. 113. – P. 1-7.

142. Oberemok, V.V. The RING for gypsy moth control: topical application of fragment of its nuclear polyhedrosis virus anti-apoptosis gene as insecticide / V.V. Oberemok, K.V. Laikova, A.S. Zaitsev, V.A. Gushchin, O.A. Skorokhod // *Pest Biochem. Phys.* – 2016. – Vol. 131. – P. 32-39.

143. Oerke, E.C. Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection / E.C. Oerke, H.W. Dehne // *Crop Protection*. – 2004. – Vol. 23. – P. 275-285.

144. Ortiz-Pérez, M.D. Environmental health assessment of deltamethrin in a malarious area of Mexico: environmental persistence, toxicokinetics and genotoxicity in exposed children / M.D. Ortiz-Pérez, A. Torres-Dosal, L.E. Batres, O.D. López-

Guzmán, M. Grimaldo, C. Carranza, I.N. Pérez-Maldonado, F. Martínez, J. Pérez-Urizar, F. Díaz-Barriga // *Environ. Health Perspect.* – 2005. – Vol. 113 (6). – P. 782-786.

145. Parker, J.S. Argonaute: a scaffold for the function of short regulatory RNAs / J.S. Parker, D. Barford // *Trends in Biochem. Sci.* – 2006. – Vol. 31. – P. 622-630.

146. Parry, M.A. Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation / M.A. Parry, P.J. Andralojc, R.A. Mitchell, P.J. Madgwick, A.J. Keys // *J. of Exp. Botany.* – 2003. – Vol. 54 (386). – P. 1321-1333.

147. Paule, M.R. Transcription by RNA polymerases I and III / M.R. Paule, R.J. White // *Nucleic Acids Research.* – 2000. – Vol. 28. – P. 1283-1298.

148. Perry, W.B. Response of soil and leaf litter microarthropods to forest application of diflubenzuron / W.B. Perry, T.A. Christiansen, S.A. Perry // *Ecotoxicology.* – 1997. – Vol. 6. – P. 87–99.

149. Petrovskii, S. Biological invasion and biological control: a case study of the gypsy moth spread / S. Petrovskii, K. McKay // *Aspects of Applied Biology.* – 2010. – Vol. 104. – P. 37-48.

150. Phillips, M.R. Risk factors for suicide in China: a national case-control psychological autopsy study / M.R. Phillips, G. Yang, Y. Zhang, L. Wang, H. Ji, M. Zhou // *Lancet.* – 2002. – Vol. 360. – P. 1728-1736.

151. Pimentel, D. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics / D. Pimentel // *J. Agr. Environ. Ethic.* – 1995. – Vol. 8. – P. 17-29.

152. Pitt, J.P. Risk assessment of gypsy moth, *Lymantria dispar* (L), in New Zealand based on phenology modeling / J.P. Pitt, J. Regniere, S. Worner // *Int. J. Biometeorol.* – 2004. – Vol. 51. – P. 295-305.

153. Portt, L. Anti-apoptosis and cell survival: a review / L. Portt, G. Norman, C. Clapp, M. Greenwood, M.T. Greenwood // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1813 (1). – P. 238-259

154. Pridgeon, J.W. Topically applied AaeIAP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti* / J.W. Pridgeon, L. Zhao, J.J. Becnel, D.A. Strickman,

G.G. Clark, K.J. Linthicum // *Journal of Medical Entomology*. – 2008. – Vol. 45. – P. 414-420.

155. Pridgeon, J.W. Erratum. Topically applied AaeIAP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti* / J.W. Pridgeon, L. Zhao, J.J. Becnel, D.A. Strickman, G.G. Clark, K.J. Linthicum // *Journal of Medical Entomology*. – 2016. – Vol. 53 (2). – P. 484.

156. Puglise, J.M. Expression Profiles and RNAi Silencing of Inhibitor of Apoptosis Transcripts in *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) / J.M. Puglise, A.S. Estep, J.J. Becnel // *Journal of medical entomology*. – 2015. – Vol. 53 (2). – P. 304-14.

157. Ragnarsdottir, K.V. Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides / K.V. Ragnarsdottir // *J. Geological Society*. – 2000. – Vol. 157. – P. 859-876.

158. Read, A.F. How to make evolution-proof insecticides for malaria control / A.F. Read, P.A. Lynch, M.B. Thomas // *PLoS Biology*. – 2009. – Vol. 7 (4).

159. Reardon, R.C. Gypchek – bioinsecticide for the gypsy moth. The forest health technology enterprise team handbook / R.C. Reardon, J.D. Podgwaite, R. Zerillo. – Washington: USDA Forest Service, 2009.

160. Rebouças, E. de L. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues / E. de L. Rebouças, J.J. do N. Costa, M.J. Passos, J.R. de S. Passos, R. van den Hurk, J.R.V. Silva // *Brazilian Archives of Biology and Technology*. – 2013. – Vol. 56. – P. 143-154.

161. Reed, J.C. Mechanisms of apoptosis / J.C. Reed // *Am. J. Pathol*. – 2000. – Vol. 157. – P. 1415-1430.

162. Rohrmann, G.F. Baculovirus molecular biology / G.F. Rohrmann // *National Library of Medicine*. – 2008.

163. Rolland, F. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms / F. Rolland, E. Baena-Gonzalez, J. Sheen // *Annual Review Plant Biology*. – 2006. – Vol. 57. – P. 675-709.

164. Rollie, J. C. Baculoviruses: sophisticated pathogens of insects / J.C. Rollie, A.L. Passarelli // PLoS Pathogens. – 2013. – Vol. 9 (11).
165. Rosell, G. Biorational insecticides in pest management / G. Rosell, C. Quero, J. Coll, A. Guerrero // J. Pesticide Science. – 2008. – Vol. 33. – P. 103-121.
166. Rowe, G.E. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis* / G.E. Rowe, A.M. Margaritis // Critical Reviews in Biotechnology. – 1987. – Vol. 6 (4). – P. 87-127.
167. Royama, T. A comparative study of models for predation and parasitism / T. Royama // Res. Popul. Ecol. Kyoto Suppl. – 1971. – Vol. 1. – P. 1-91.
168. Rumble, J.M. Diverse functions within the IAP family / J.M. Rumble, C.S. Duckett // J. Cell Sci. – 2008. – Vol. 121 (21). – P. 3505-3507.
169. Salz, H.K. Sex determination in *Drosophila*: the view from the top / H.K. Salz, J.W. Erickson // Fly. – 2010. – Vol. 4 (60). – P. 70.
170. Sanchis, V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis* / V. Sanchis // Agronomy for Sustainable Development. – 2011. – Vol. 31. – P. 217-231.
171. Schliess, F. The cellular hydration state: role in apoptosis and proliferation / F. Schliess, D. Häussinger // Signal Transduct. – 2005. – P. 297-302.
172. Schultz, S.J. RNase H activity: Structure, specificity, and function in reverse transcription / S.J. Schultz, J.J. Champoux // Virus Research. – 2008. – Vol. 134. – P. 86-103.
173. Sexton, S.S. The economics of pesticides and pest control / S.S. Sexton, Z. Lei, D. Zilberman // International Review of Environmental and Resource Economics. – 2007. – Vol. 1 (3). – P. 271–326.
174. Shah, K. Cadmium suppresses phosphate level and inhibits the activity of phosphatases in growing rice seedlings / K. Shah, R.S. Dubey // J. of Agronomy and Crop Sci. – 1998. – Vol. 180. – P. 223-231.
175. Sharma, V.K. Antisense oligonucleotides: modifications and clinical trials / V.K. Sharma, R.K. Sharma, S.K. Singh // Med. Chem. Comm. – 2014. – Vol. 5. – P. 1454-1471.

176. Shechner, D.M. The structural basis of RNA-catalyzed RNA polymerase / D.M. Shechner, D.P. Bartel // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 18 (9). – P. 1036-1042.
177. Shi, Y. A conserved tetrapeptide motif: Potentiating apoptosis through IAP-binding / Y. Shi // *Cell Death Differ.* – 2002. – Vol. 9. – P. 93–95.
178. Slamti, L. Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are non-hemolytic / L. Slamti, S. Perchat, M. Gominet, G. Vilas-Bôas, A. Fouet, M. Mock, V. Sanchis, J. Chaufaux, M. Gohar, D. Lereclus // *J. Bacteriology*. – 2004. – Vol. 186 (11). – P. 3531-3538.
179. Slavicek, J.M. Identification of a *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus isolate that does not accumulate few polyhedra mutants during extended serial passage in cell culture / J.M. Slavicek, N. Hayes-Plazolles, M.E. Kelly // *Biol. Control*. – 2011. – Vol. 22 (2). – P. 159-168.
180. Sogorb, M.A. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis / M.A. Sogorb // *Toxicol. Lett.* – 2002. – Vol. 128. – P. 215-228.
181. Sohail, A. Efficacy of different botanical materials against aphid *Toxoptera aurantii* on tea (*Camellia sinensis* L.) cuttings under high shade nursery / A.Sohail, F.S. Hamid, A. Waheed, N. Ahmed, N. Aslam, Q. Zaman, F. Ahmed, S. Islam. // *Journal of Materials and Environmental Science*. – 2012. – Vol. 3 (6). – P. 1065–1070.
182. Srinivasula, S.M. IAPs: what's in a name? / S.M. Srinivasula, J.D. Ashwell // *Molecular Cell*. – 2008. – Vol. 30, (2). – P. 123-135.
183. Steinhaus, E.A. Possible use of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an aid in the biological control of the alfalfa caterpillar / E.A. Steinhaus // *Hilgardia*. – 1951. – Vol. 20. – P. 359-381.
184. Stewart, L.M. Construction of an improved baculovirus insecticides containing an insect-specific toxin gene / L.M. Stewart, M. Hirst, M. López Ferber, A.T. Merryweather, P.J. Cayley, R.D. Possee // *Nature*. – 1991. – Vol. 352. – P. 85-88.

185. Sugiura, M. Insect spiracle as the main penetration route of pyrethroids / M. Sugiura, Y. Horibe, H. Kawada, M. Takagi // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. – 2008. – Vol. 91 (3). – P. 135-140.
186. Swevers, L. The possible impact of persistent virus infection on the function of the RNAi machinery in insects: a hypothesis / L. Swevers, J. BroeckVanden, G. Smagghe // *Front. Physiol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 319.
187. Symes, C.B. Some recent progress in the study of insecticides and their application for the control of vectors of disease / C.B. Symes // *The Journal of the Royal Society for the Promotion of Health*. – 1952. – Vol. 72 (5). – P. 498-514.
188. Swift, M.C. Effects of dimilin on freshwater litter decomposition / M.C. Swift, R.A. Smucker, K.W. Cummins // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 1988. – Vol. 7. – P. 161-166.
189. Szabo-Nagy, A. Induction of soluble phosphatases under ionic and nonionic osmotic stresses in wheat / A. Szabo-Nagy, G. Galiba, L. Erdei // *Journal of Plant Physiology*. – 1992. – Vol. 140. – P. 629-633.
190. Szewczyk, B. Baculovirus biopesticides – a safe alternative to chemical protection of plants / B. Szewczyk, L. Rabalski, E. Krol, W. Sihler, M.L. de Souza // *J. Biopestic.* – 2009. – Vol. 2. – P. 209-216.
191. Szewczyk, B. Baculoviruses – re-emerging biopesticides / B. Szewczyk, L. Hoyos-Carvajal, M. Paluszek, I. Skrzecz, M. Lobo de Souza // *Biotechnology Advances*. – 2006. – Vol. 24 (2). – P. 143-160.
192. Tabashnik, B.E. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory / B.E. Tabashnik, A.J. Gassmann, D.W. Crowder, Y. Carrière // *Nat. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 26. – P. 199-202.
193. Tanoi, K. Leaf senescence by magnesium deficiency / K. Tanoi, N.I. Kobayashi // *Plants*. – 2015. – Vol. 4. – P. 756-772.
194. Terenius, O. RNA interference in *Lepidoptera*: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design / O. Terenius, A. Papanicolaou, J.S. Garbutt, I. Eleftherianos, H. Huvenne, S. Kanginakudru, M. Albrechtsen, C. An, J.L. Aymeric, A. Barthel, P. Bebas, K. Bitra, A. Bravo, F.

Chevalier, D.P. Collinge, C.M. Crava, R.A. de Maagd, B. Duvic, M. Erlandson, I. Faye, G. Felföldi, H. Fujiwara, R. Futahashi, A.S. Gandhe, H.S. Gatehouse, L.N. Gatehouse, J.M. Giebultowicz, I. Gómez, C.J. Grimmelikhuijzen, A.T. Groot, F. Hauser, D.G. Heckel, D.D. Hegedus, S. Hrycaj, L. Huang, J.J. Hull, K. Iatrou, M. Iga, M.R. Kanost, J. Kotwica, C. Li, J. Li, J. Liu, M. Lundmark, S. Matsumoto, M. Meyering-Vos, P.J. Millichap, A. Monteiro, N. Mrinal, T. Niimi, D. Nowara, A. Ohnishi, V. Oostru, K. Ozaki, M. Papakonstantinou, A. Popadic, M.V. Rajam, S. Saenko, R.M. Simpson, M. Soberón, M.R. Strand, S. Tomita, U. Toprak, P. Wang, C.W. Wee, S. Whyard, W. Zhang, J. Nagaraju, R.H. Ffrench-Constant, S. Herrero, K. Gordon, L. Swevers, G. Smagghe // *J. Insect Physiol.* – 2011. – Vol. 57. – P. 231-245.

195. Thompson, J.D. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice / J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22. – P. 4673-80.

196. Thorp, H.H. The importance of being r: greater oxidative stability of RNA compared with DNA / H.H. Thorp // *Chem. Biol.* – 2000. – Vol. 7. – P. 33-36.

197. Timmons, L. Inducible systemic RNA silencing in *Caenorhabditis elegans* / L. Timmons, H. Tabara, C.C. Mello, A.Z. Fire // *Cellular and Molecular Biology.* – 2003. – Vol. 14 (7). – P. 2972-2983.

198. Tomlin, C. The pesticide manual / C. Tomlin. – Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1995. – 1341 p.

199. Tomoyasu, Y. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium* / Y. Tomoyasu, S.C. Miller, S. Tomita, M. Schoppmeier, D. Grossmann, G. Bucher // *Genome biology.* – 2008. – Vol. 9 (1).

200. Toth, P.P. Antisense therapy and emerging applications for the management of dyslipidemia / P.P. Toth // *J. of Clinical Lipidology.* – 2011. – Vol. 5. – P. 441-449.

201. Trowsdale, J. Alkaline phosphatases / J. Trowsdale, D. Martin, D. Bicknell, I. Campbell // *Biochem. Soc. Transactions.* – 1990. – Vol. 18. – P. 178-180.

202. Turner, C.T. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding / C.T. Turner, M.W. Davy, R.M. MacDiarmid, K.M. Plummer, N.P. Birch, R.D. Newcomb // *Insect Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 15. – P. 383–391.
203. Turusov, V. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks / V. Turusov, V. Rakitsky, L. Toamtis // *Environ. Health Perspect.* – 2002. – Vol. 110. – P. 125-128.
204. Vaerman, J.L. Antisense oligodeoxyribonucleotides suppress hematologic cell growth through stepwise release of deoxyribonucleotides / J.L. Vaerman, P. Moureau, F. Deldime, P. Lewalle, C. Lammineur, F. Morschhauser, P. Martiat // *Blood.* – 1997. – Vol. 90. – P. 331-339.
205. van Steenwyk, R.A. Food quality protection act launches search for pest management alternatives / R.A. van Steenwyk, F.G. Zalom // *Calif. Agric.* – 2005. – Vol. 59. – P. 7-10.
206. Vandergaast, R. Insect inhibitor-of-apoptosis (IAP) proteins are negatively regulated by signal-induced N-terminal degrons absent within viral IAP proteins / R. Vandergaast, J.K. Mitchell, N.M. Byers, P.D. Friesen // *J. Virol.* – 2015. – Vol. 89. – P. 4481-4493.
207. Vanhanen, H. Climate change and range shifts in two insect defoliators: gypsy moth and nun moth – a model study / H. Vanhanen, T.O. Veteli, S.Päivinen, S. Kellomäki, P. Niemelä // *Silva Fenn.* – 2007. – Vol. 41. – P. 621-638.
208. Volkman, L.E. Nucleopolyhedrovirus interactions with their insect hosts / L.E. Volkman // *Adv. Virus Res.* – 1997. – Vol. 48. – P. 313-348.
209. Vucic, D. Inhibition of reaper-induced apoptosis by interaction with inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) / D. Vucic, W.J. Kaiser, A.J. Harvey, L.K. Miller // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1997. – Vol. 94. – P. 10183-10188.
210. Walker, K. Cost-comparison of DDT and alternative insecticides for malaria control / K. Walker // *Medical and Veterinary Entomology.* – 2000. – Vol. 14. – P. 345-354.

211. Walker, K. Inhibition of protein synthesis by anti-5.8 SrRNA oligodeoxyribonucleotides / K. Walker, S.A. Elela, R.N. Nazar // *Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – Vol. 265. – P. 2428-2430.
212. Wang, J.J. The effect of the insecticide dichlorvos on esterase extracted from the psocids, *Liposcelis bostrychophila* and *L. entomophila* / J.J. Wang, W.X. Cheng, W. Ding, Z.M. Zhao // *J. Insect Sci.* – 2004. – Vol. 4. – P. 23-27.
213. Wang, Y. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control / Y. Wang, H. Zhang, H. Li, X. Miao // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 8 (6).
214. Warner, J.R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast / J.R. Warner // *Trends in Biochemical Sciences*. – 1999. – Vol. 24. – P. 437-440.
215. Weber, D. Colorado beetle: pest on the move / D. Weber // *Pestic. Outlook*. – 2003. – Vol. 14. – P. 256-259.
216. Webster, J.P. Estimating the economic benefits of alternative pesticide usage scenarios: wheat production in the United Kingdom / J.P. Webster, R.G. Bowles, N.T. Williams. // *Crop Production*. – 1999. – Vol. 18. – P. 83-89.
217. Weisberg, M. The robust Volterra principle / M. Weisberg, K. Reisman // *Phil. Sci.* – 2008. – Vol. 75. – P. 106-131.
218. Weiss, B. Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes / B. Weiss, G. Davidkova, L.W. Zhou // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 1999. – Vol. 55. – P. 334-358.
219. Weston, D.P. Multiple origins of pyrethroid insecticide resistance across the species complex of a non-target aquatic crustacean, *Hyalella azteca* / D.P. Weston, H.C. Poynton, G.A. Wellborn, M.J. Lydy, B.J. Blalock, M.S. Sepulveda, J.K. Colbourne // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2013. – Vol. 110. – P. 16532-16537.
220. Wheatley, G.A. Residues of chlorinated hydrocarbon insecticides in some farm soils in England / G.A. Wheatley, J.A. Hardman, A.H. Strickland // *Plant Pathology*. – 1962. – Vol. 11. – P. 81-90.

221. Whyard, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides / S. Whyard, A.D. Singh, S. Wong // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2009. – Vol. 39. – P. 824-832.
222. Willis, L.G. Sequence analysis of the complete genome of *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus and the identification of a baculoviral photolyase gene / L.G. Willis, R. Seipp, T.M. Stewart, M.A. Erlandson, D.A. Theilmann // *Virology*. – 2005. – Vol. 338(2). – P. 209-226.
223. Yamamoto, I. Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor / I. Yamamoto, J. Casida. – Tokyo: Springer-Verlag, 1999. – P. 3-27.
224. Yang, M. Increased activity and reduced sensitivity of acetylcholinesterase associated with malathion resistance in a field population of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) / M. Yang, J. Zhang, K.Y. Zhu, T. Xuan // *Pestic. Biochem. Physiol.* – 2008. – Vol. 91. – P. 32-38.
225. Yu, N. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions / N. Yu, O. Christiaens, J. Liu, J. Niu, K. Cappelle, S. Caccia, H. Huvenne, G. Smaghe // *Insect Science*. – 2013. – Vol. 20. – P. 4-14.
226. Zamecnik, P.C. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide / P.C. Zamecnik, M.L. Stephenson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1978. – Vol. 75. – P. 289-294.
227. Zhang, J.H. DNA fragmentation in apoptosis / J.H. Zhang, M. Xu // *Cell Res*. – 2000. – Vol. 10. – P. 205-211.
228. Zhang, Z. A greedy algorithm for aligning DNA sequences / Z. Zhang, S. Schwartz, L. Wagner, W. Miller // *J. Comput. Biol.* – 2000. – Vol. 7. – P. 203-214.
229. Zhou, H.C. Synthesis of carbamates from aliphatic amines and dimethyl carbonate catalyzed by acid functional ionic liquids / H. Zhou, F. Shi, X. Tian, Q. Zhang, Y. Deng // *J. of Mol. Cat. A: Chem.* – 2007. Vol. – 271. – P. 89-92.
230. Zotti, M.J. RNAi technology for insect management and protection of beneficial insects from diseases: lessons, challenges and risk assessments / M.J. Zotti, G. Smaghe // *Neotrop Entomol.* – 2015. – Vol. 44 (3). – P. 147-213.

231. Агол, В.И. Как вирусы вызывают болезни / В.И. Агол // Сорос. обр. журн. – 1997. – № 9. – С. 27-31.
232. Бахвалов, С.А. Детекция ДНК вируса ядерного полиэдроза в образцах из яиц и гусениц в разных фазах популяционной динамики непарного шелкопряда *Lymantria dispar* (L.) / С.А. Бахвалов и др. // Вопросы вирусологии. – 2012. – Т. 57 (4). – С. 35-37.
233. Белов, Д.А. Химические методы и средства защиты растений в лесном хозяйстве и озеленении / Д.А. Белов. – М.: МГУЛ, 2003. – 128 с.
234. Ванюшин, Б.Ф. Апоптоз у растений / Б.Ф. Ванюшин // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 3-38.
235. Воронцов, А.И. Лесная энтомология / А.И. Воронцов. – М.: Высшая школа, 1982. – 384 с.
236. Гулий, В.В. Вирусные болезни насекомых и их диагностика / В.В. Гулий, С.Ю. Рыбина. – Кишинев: Штиинца, 1988. – 187 с.
237. Дагаев, М.В. Усатые агрессоры или всё о войне с тараканами / М.В. Дагаев. – СПб: Лань, 1997. – 112 с.
238. Зинченко, В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность / В.А. Зинченко – М.: Колос-С, 2005. – 232 с.
239. Злотин, А.З. Техническая энтомология / А.З. Злотин. – К: Наукова думка, 1989. – 184 с.
240. Ильиных, А.В. Вертикальная передача бакуловирусов и закономерности проявления полиэдрозов у лесных насекомых-филлофагов: дис. ... д-р.биол. наук: 06.01.11. / Екатеринбург, 2007. – 282 с.
241. Кагава, Я. Биомембраны / Я. Кагава. – М.: Высш. школа, 1985. – 303 с.
242. Киреева, Н.М. Экология и физиология непарного шелкопряда / Н.М. Киреева. – К: Наукова думка, 1983. – 128 с.
243. Косовский, Г.Ю. Методические рекомендации по выделению и культивированию мезенхимных стволовых клеток (МСК) из костного мозга животных / Г.Ю. Косовский. – М.: Отделение ветеринарной медицины Российской академии сельскохозяйственных наук, Всероссийский научно-

исследовательский и технологический институт биологической промышленности, 2009. – 20 с.

244. Косовский, Г.Ю. Индукция остеогенной дифференцировки МСК. Получение дифференцированных клеток и ткани *in vitro* / Г.Ю. Косовский и др. // Ветеринария и кормление. – 2014. – № 6. – С. 53-56.

245. Мельников, Н.Н. Пестициды. Химия, технология и применение / Н.Н. Мельников. – М.: Химия, 1987. – 712 с.

246. Оберемок, В.В. Патент України на корисну модель №36445, МПК (2006) А01М 1/20, "Засіб знищення листогризучих комах з ряду лускокрилих", Опубл. 27.10.2008а. Бюл. №20.

247. Оберемок, В.В. Доказательство трансовариальной передачи вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus (*fam. Baculoviridae*) методом RAPD-PCR / В.В. Оберемок // Журнал общей биологии. – 2008b. – Т. 69 (5). – С. 397-400.

248. Оберемок, В.В. ДНК-маркери у вивченні взаємовідносин між вірусом ядерного поліедрозу та його хазяїном непарним шовкопрядом: автореферат / В.В. Оберемок // канд. біол. наук: 03.00.06 вірусологія. – 2011. – С. 22.

249. Одум, Ю. Экология: в 2-х т. / Ю. Одум. – М.: Мир, 1986. – Т. 1 – 328 с.

250. Попов, С.Я. Основы химической защиты растений. Учебное пособие (под ред. Попова С.Я.) / С.Я. Попов, Л.А. Дорожкина, В.А. Калинин. – М.: Арт-Лион, 2003. – 208 с.

251. Тарасевич, Л.М. Вирусы насекомых служат человеку / Л.М. Тарасевич. – М.: Наука, 1985. – 143 с.

252. Ткачѳв, А.В. Пиретроидные инсектициды – аналоги природных защитных веществ растений / А.В. Ткачѳв. // Соросовский образовательный журнал. – 2004. – Т. 8 (2). – С. 56-63.

253. Тыщенко, В.П. Физиология насекомых / В.П. Тыщенко. – М.: Высшая школа, 1986. – 330 с.

254. Харсун, А.И. Биохимия насекомых / А.И. Харсун. – Кишинев: Картя Молдовеняске, 1976. – 335 с.

255. Шестоपालов, М.В. Результаты биоэкологического мониторинга непарного шелкопряда в полезащитных лесных полосах и лесных насаждениях / М.В. Шестоपालов // Научные труды Южного филиала Национального университета биоресурсов и природопользования Украины "Крымский агротехнологический университет". Серия: Сельскохозяйственные науки. – 2011. – № 137. – С. 170-175.

256. Шрадер, Г. Новые фосфорорганические инсектициды / Г. Шрадер. – М.: Мир, 1965. – 478 с.

257. Якушкина, Н.И. Физиология растений / Н.И. Якушкина. – М.: Просвещение, 1980. – 300 с.