

ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ

УДК 632.75:632.951

**РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ ИННОВАЦИОННОГО
ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО ИНСЕКТИЦИДА ЯВОЛ-11 ДЛЯ КОНТРОЛЯ
CEROPLASTES JAPONICUS GREEN (ПОДОТРЯД STERNORRHYNCHA)**

**Юрий Владимирович Плугатарь¹, Никита Витальевич Гальчинский²,
Екатерина Васильевна Яцкова¹, Александр Константинович Шармагий¹,
Владимир Владимирович Оберемок^{1,2}**

¹Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН,
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита, спуск Никитский, 52

²ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»,
295007, Республика Крым, г. Симферополь, проспект Академика Вернадского, 4
E-mail: pcr.product@gmail.com

Изобретенные в 2008 г. контактные олигонуклеотидные инсектициды (олинциды или ДНК-инсектициды) на основе платформы контактно вводимой антисмысловой ДНК-биотехнологии (КВАДб) были существенно улучшены и переосмыслены. КВАДб (или метод "генетической застёжки-молнии") объединяет молекулярную генетику, биоинформатику и синтез нуклеиновых кислот *in vitro*. Главным сдвигом парадигмы стала демонстрация того, что немодифицированная антисмысловая ДНК может действовать как контактный инсектицид. Ключевые прорывы включали идентификацию удобных целевых генов (генов рРНК), механизма действия (ДНК-сдерживание) и обнаружение насекомых-вредителей из подотряда грудохоботных (*Sternorrhyncha*) с высокой восприимчивостью к олинцидам. Данный класс инсектицидов нового поколения создает возможности для разработки инсектицидов, предназначенных для отдельных популяций насекомых-вредителей. В данной работе, проведенной на личинках *Ceroplastes japonicus Green* в открытом грунте, показан высокий потенциал использования олинцида ЯВОЛ-11 (5'-CGACCGACGAA-3') в борьбе с ложнощитовкой и их потенциал в качестве замены неселективным фосфоорганическим инсектицидам.

Ключевые слова: ДНК-инсектициды; олинциды; контактно вводимая антисмысловая ДНК-биотехнология; КВАДб; метод "генетической застёжки-молнии"

Введение

Немодифицированная ДНК, как уникальная молекула с программируемыми свойствами и природным происхождением, представляет значительный интерес для научного сообщества. Тем не менее, длительное время существовало мнение, что немодифицированные олигонуклеотиды обладают токсическим эффектом на клетки и подвержены быстрому разрушению под воздействием нуклеаз в эукариотических клетках [1], включая насекомых [2]. В научной литературе даже утверждалось, что использование фосфодиэфирных антисмысловых олигонуклеотидов в экспериментах нецелесообразно [3]. Механизм действия немодифицированной антисмысловой ДНК и её потенциал в качестве контактного инсектицида оставались неизученными, особенно в контексте насекомых-вредителей. Попытки проверить эту гипотезу не предпринимались до начала XXI века. Неожиданный и удивительный поворот с немодифицированными антисмысловыми олигонуклеотидами в защите растений произошел в 2008 г., когда было показано, что короткая немодифицированная антисмысловая ДНК оказывает значительное инсектицидное действие на насекомых-вредителей [4]. Впервые знак равно между антисмысловыми олигодезоксирибонуклеотидами и контактными инсектицидами был поставлен в экспериментах с непарным шелкопрядом *Lymantria dispar* (L.), что привело к разработке платформы контактно вводимой антисмысловой ДНК-биотехнологии

(КВАДб) [5-8]. Первые олигонуклеотидные инсектициды (кратко, олинциды или ДНК-инсектициды) длиной 18-20 нуклеотидов, основанные на антиапоптотических генах, показали эффективность на гусеницах непарного шелкопряда, как не содержащих бакуловируса, так и инфицированных вирусом ядерного полиэдроза [9]. Данное открытие позволило использовать нуклеиновые кислоты в качестве инновационных контактных инсектицидов, что стало новым этапом в борьбе с насекомыми-вредителями. Ученые, изучающие механизм РНК-интерференции, спустя три года успешно адаптировали эту концепцию, применив двуцепочечные фрагменты РНК в качестве эффективных контактных инсектицидов против насекомых-вредителей [10].

В 2019 г. эта инновация была существенно улучшена и переосмыслена [11]. В свою очередь КВАДб имеет ряд особенностей, которые отличают ее от всех современных классов химических инсектицидов и технологий защиты растений, развивающихся сегодня: немодифицированная антисмысловая ДНК в качестве действующего вещества, ДНК-сдерживание (ДНКс) как механизм действия, пре-рРНК и рРНК насекомых в качестве молекулярной мишени [12-14]. Олигонуклеотидные инсектициды основаны на методе «генетической застёжки-молнии», действующем посредством образования комплементарного дуплекса ДНК олинцид-рРНК (напоминает механизм застёжки-молнии), который «застёгивает» экспрессию целевой рРНК и приводит к гибели вредителей. Олигонуклеотидные инсектициды действуют на насекомых-вредителей из подотряда грудехоботных (Полужесткокрылых) через механизм ДНКс, состоящий из 2 этапов: 1) «арест» рРНК и/или пре-рРНК и гиперкомпенсация целевой рРНК; 2) целевая рРНК и/или деградация пре-рРНК, рекрутирующая рРНКазу [13-15]. Использование пре-рРНК и зрелой рРНК в качестве мишени для олинцидов демонстрирует высокую эффективность. Это связано с тем, что пре-РНК и зрелая рРНК составляют 80% всей РНК в клетке. Разрушение рРНК неизбежно приводит к нарушению биосинтеза белка, что вызывает гибель насекомых-вредителей [9]. Если возникает резистентность к инсектицидам, можно применять различные стратегии. Как правило, новые и эффективные олинциды можно легко воссоздать, смещая целевой сайт влево или вправо от устойчивого к олинциду сайта целевой зрелой рРНК и/или пре-рРНК [11, 13]. Согласно исследованиям, контактная доставка немодифицированной антисмысловой ДНК намного эффективнее [16], чем пероральная доставка немодифицированной антисмысловой ДНК из-за активных ДНКаз, присутствующих в пищеварительном тракте насекомых [17, 18].

Благодаря очень эффективному и простому алгоритму метод ДНК-управляемой «генетической застёжки-молнии» (КВАДб) является уникальной и очень мощной альтернативой другим антисмысловым подходам в борьбе с насекомыми-вредителями, основанным на дуплексах немодифицированных нуклеиновых кислот и РНК-управляемых нуклеазах: РНК-интерференции и CRISPR/Cas9. Инновационные технологии борьбы с насекомыми-вредителями (РНКи, КВАДб, CRISPR/Cas9) основаны на образовании дуплексов немодифицированных нуклеиновых кислот (РНКи: направляющая РНК-мРНК; КВАДб: направляющая ДНК-рРНК; CRISPR/Cas9: направляющая РНК-геномная ДНК) и действии нуклеаз, управляемых нуклеиновыми кислотами (РНКи: Argonaute, кратко Ago; КВАДб: рРНКазы; CRISPR/Cas9: CRISPR-ассоциированный белок 9, кратко Cas9) [31]. В то время как РНКи и CRISPR/Cas9 не были обнаружены на насекомых-вредителях и изначально имели фундаментальное значение, а не практическое, КВАДб была обнаружена на насекомых-вредителях как практический инструмент, а недавно была выявлена фундаментальная важность механизма ДНКс, играющего роль в биогенезе рРНК [9, 13, 14, 32]. На сегодняшний день, РНКи и CRISPR/Cas9 являются инструментами для манипуляций с немодифицированными нуклеиновыми кислотами в лабораторных условиях, у них нет

простых алгоритмов для создания конечных продуктов для борьбы с насекомыми-вредителями; каждый отдельный случай является особенным и обычно решается методом проб и ошибок.

Олигонуклеотидные инсектициды обладают низким углеродным следом, высокой безопасностью для нецелевых организмов, быстрой биоразлагаемостью в экосистемах и избеганием резистентности целевого участка. В то время как современные химические инсектициды требуют месяцев и даже лет для биodeградации бактериями и грибами, олигонуклеотидные инсектициды в значительной степени биodeградируются в течение нескольких часов в присутствии нуклеаз [33]. Олионциды имеют потенциал дополнить существующий рынок инсектицидов и создать экологический прецедент для средств защиты растений, где эффективность инсектицида будет определяться его безопасностью для нецелевых организмов [33]. Преимущество использования природных олигомеров, немодифицированных антисмысловых олигонуклеотидов, по-видимому, является самым безопасным способом, поскольку клетки всех живых организмов содержат вездесущие нуклеазы, которые могут их нейтрализовать [8]. Следовательно, для олигонуклеотидных инсектицидов нет необходимости искать методы ускоренной биodeградации. Принцип использования олигонуклеотидных пестицидов заключается в том, что они должны иметь достаточно времени, чтобы подействовать в нужном месте и на нужный организм до их быстрой биodeградации (и они успешно делают это на насекомых-вредителях из подотряда грудехоботных и других вредителях) [8, 13]. Напротив, из-за устойчивости к биodeградации обычные химические инсектициды имеют слишком много времени для своего действия не только в нужном месте и не только на нужный организм [33]. В результате большинство химических инсектицидов были запрещены тем или иным образом после определенного времени использования в защите растений, когда появились эффективные конкуренты с доказанной или предполагаемой большей безопасностью [34]. В последнее время идея олигонуклеотидных инсектицидов привлекла внимание ученых и специалистов в защите растений [35-38], и в определенной степени доступность данных инсектицидов оставалась под вопросом. Если в ближайшем будущем будет найден баланс между эффективностью и стоимостью данных средств борьбы с вредителями, то рынок инсектицидов будет в изобилии пополнен олинцидами, специфичными для отдельных видов вредителей.

Цель исследований – создание и применение олинцидов на основе КВАДб, а также выявление их биологической эффективности в открытом грунте против популяции фитофага – японской восковой ложнощитовки (*Ceroplastes japonicus* Green) из подотряда грудехоботных в арборетуме «ФГБУН НБС-НИЦ».

Материалы и методы

Исследования проводились в период с сентября по октябрь в арборетуме Никитского ботанического сада в Крыму, недалеко от Ялты, на берегу Черного моря (координаты: 44°30'41.9'N и 34°13'57.3'E). Насекомое-вредитель *C. japonicus* было обнаружено и идентифицировано на деревьях *Ilex aquifolium* L. (Aquifoliaceae).

Олинцид ЯВОЛ-11 (5'-CGACCGACGAA-3') разработан на основе последовательности 28S рРНК, полученной из базы данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; идентификатор последовательности: KF823997.1; диапазон: 77-67). Разработанный олигонуклеотид ACGT-11 (5'-ACGTACGTACG-3') использовался в качестве контрольной последовательности. Все олигонуклеотиды растворяли в воде, не содержащей нуклеазы, в концентрации 100 нг/мкл и наносили на листья *I. aquifolium* с помощью ручного опрыскивателя из расчета 10 мл на м². Для сравнения была включена контрольная группа, обрабатываемая только

водой. Фитофаг *C. japonicus* в эксперименте было представлено личинками первого и второго возраста. Эксперимент проводили в трехкратной повторности (от 80 до 90 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента). Смертность рассчитывали на 4-е, 7-е и 10-е сутки; число погибших особей делили на общее число особей на листе и умножали на 100%.

Последовательности ЯВОЛ-11-олиониды и контрольного олигонуклеотида ACGT-11 были синтезированы на ДНК-синтезаторе ASM-800ET (BIOSSET, Новосибирск, Россия). Молекулярную массу синтезированных последовательностей ДНК определяли методом масс-спектрометрии с MALDI-TOF. Теоретические значения m/z рассчитывали с помощью программы ChemDraw 18.0 (CambridgeSoft, Кембридж, Массачусетс, США) (табл. 1).

Таблица 1

Результаты анализа синтезированных олигонуклеотидов методом MALDI-TOF

Олигонуклеотид	Теоретическое соотношение m/z	Практическое соотношение m/z
ЯВОЛ-11	3334,62	3343,60
ACGT-11	3340,61	3336,71
ЯВОЛ28S-F, ген 28S рРНК, прямой праймер	5162,92	5172,40
ЯВОЛ28S-R, ген 28S рРНК, обратный праймер	5475,97	5485,60

В качестве стандарта использовали фосфорорганический инсектицид фенитрофосфат: [О,О-Диметил-О-(3-метил-4-нитрофенил)тиофосфат] (Международный союз теоретической и прикладной химии [ИЮПАК]); IRAC МоА 1В фосфорорганические соединения; Сумитион®; 2 г/л; Nufarm, Тувумба, Австралия); из расчета 10 мл на м².

Личинок гомогенизировали в пробирках объемом 1,5 мл с помощью пестика и выделяли РНК с помощью набора ExtractRNA (Евроген, Москва, Россия) согласно протоколу производителя. Были подготовлены три независимые биологические повторности, каждая из которых включала по 10 личинок на группу обработки. Концентрацию и качество РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) и горизонтального гель-электрофореза. Электрофорез проводили в 1,5% агарозном геле с буфером TBE (10 В/см в течение 30 мин), нанося по 5 мкл РНК на дорожку. Для обратной транскрипции РНК *C. japonicus* (0,4 мкг) отжигали с праймером ЯВОЛ28S-R (табл. 2) с использованием набора MMLV Reverse Transcriptase (Евроген, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Таблица 2

Последовательности праймеров, используемые для ПЦР-амплификации в реальном времени 28S рРНК *Ceroplastes japonicus* Green

Ген	Праймер	Последовательность праймеров (5' -3')	Ампликон	ID последовательность в GenBank
28S рРНК	ЯВОЛ28S-F	5'-ACAGAGCCCGTGAATCC-3'	169 п.н.	KF823997.1
	ЯВОЛ28S-R	5'-CGAACTGAAAACGCGTCC-3'		

Для реакции ПЦР в реальном времени использовали 2 мкл кДНК с прямым и обратным праймерами (табл. 2) и смесью FastStart SYBR Green MasterMix (Roche, Базель, Швейцария). Условия ПЦР были следующими: 10 мин начальной денатурации при 95°C; 30 циклов по 10 с при 95°C, 15 с при 56°C и 14 с при 72°C. Реакции проводили трижды. Анализ кривой плавления подтвердил специфичность амплификации.

Стандартная ошибка среднего (SE) определялась и анализировалась с помощью t-критерия Стьюдента для оценки значимости различий в концентрации 28S рРНК между контрольными и экспериментальными группами на четвертые сутки. Для оценки значимости различий в смертности между контрольными и экспериментальными группами на четвертые, седьмые и десятые сутки применялся непараметрический критерий хи-квадрат Пирсона (χ^2) с поправкой Йетса. Все вышеперечисленные расчеты выполнялись с помощью программы Prism 9 (GraphPad Software Inc., Бостон, Массачусетс, США).

Результаты и обсуждение

Инсектицидный потенциал 11-мерного олигонуклеотидного инсектицида ЯВОЛ-11 оценивали на основе его влияния на жизнеспособность личинок *C. japonicus*. Сконструированный олигонуклеотидный инсектицид ЯВОЛ-11 продемонстрировал высокую биологическую эффективность, вызывая экспоненциальный рост смертности личинок при обработке в концентрации 0,1 г/л воды, достигая максимального эффекта к 10-м суткам (рис. 1).

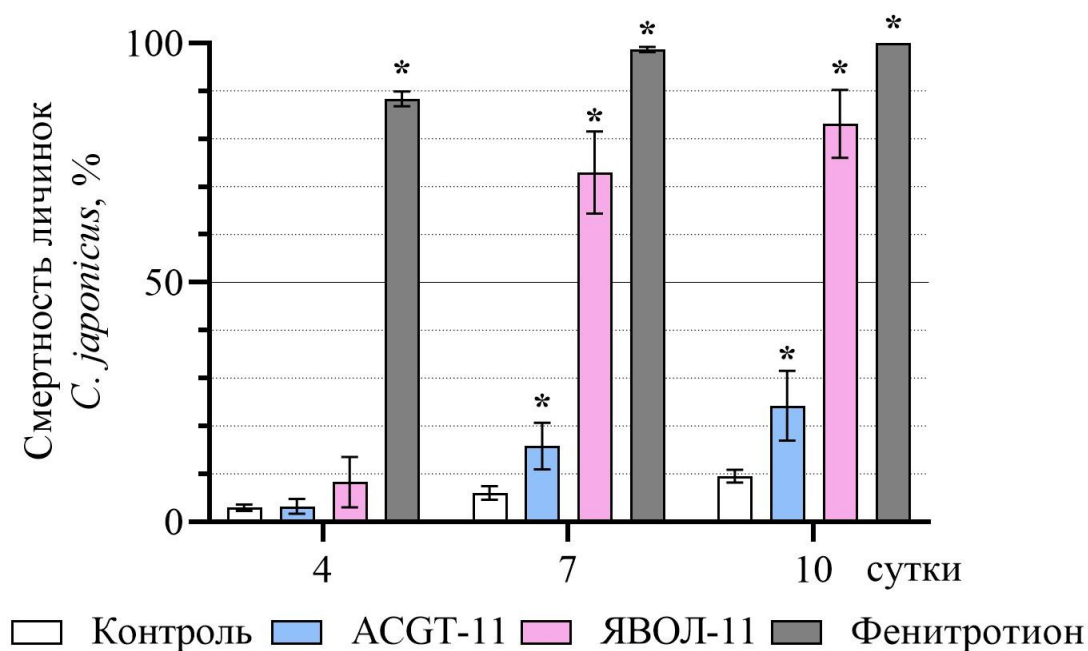


Рис. 1 Динамика смертности *Ceroplastes japonicus* Green после их контактной обработки водой, ЯВОЛ-11-олионцидом, АСГТ-11-фрагментом и фосфорорганическим инсектицидом фенитротином. Достоверность различий в группах против контроля, обработанным водой, обозначена * при $p < 0,01$.

На седьмые и десятые сутки после обработки личинок ДНК-олигонуклеотидами достоверное увеличение смертности насекомых по сравнению с контролем было обнаружено в группах "АСГТ-11" ($\chi^2 = 9,099$, $p < 0,05$, $N = 431$, $df = 1$; $\chi^2 = 27,548$,

$p < 0,01$, $N = 591$, $df = 1$), "ЯВОЛ-11" ($\chi^2 = 217,023$, $p < 0,01$, $N = 697$, $df = 1$; $\chi^2 = 362,481$, $p < 0,01$, $N = 736$, $df = 1$) и "Фенитротион" ($\chi^2 = 435,974$, $p < 0,01$, $N = 504$, $df = 1$; $\chi^2 = 203,550$, $p < 0,01$, $N = 266$, $df = 1$). В среднем погибло на седьмые сутки $6,06 \pm 1,40\%$, $15,83 \pm 4,85\%$, $72,95 \pm 8,56\%$ и $98,66 \pm 0,57\%$ личинок из групп контроля, "АСГТ-11", "ЯВОЛ-11" и "Фенитротион", соответственно. На десятые сутки эксперимента число погибших насекомых повысилось и достигло $10,28 \pm 2,25\%$, $24,24 \pm 7,28\%$, $83,11 \pm 7,06\%$ и 100% в контрольной группе, "АСГТ-11", "ЯВОЛ-11" и "Фенитротион", соответственно (рис. 1). Таким образом, олигонуклеотидный инсектицид "ЯВОЛ-11" показал существенную эффективность по сравнению с фосфорорганическим инсектицидом фенитротионом. Учитывая природное происхождение олигонуклеотидных инсектицидов, этот подход может составить значительную конкуренцию фосфорорганическим инсектицидам и другим неселективным химическим инсектицидам.

Было установлено, что исследуемая концентрация 28S рРНК у насекомых, контактно обработанных ЯВОЛ-11-фрагментом, была значительно ниже (в 3,1 раза), чем у контрольных, обработанных водой ($p < 0,01$, рис. 2). Это можно объяснить множеством партнеров по связыванию рРНК, ограничивающих её доступность для антисмысловых олигонуклеотидов, и более успешным привлечением ДНК-направленной рРНКазы, такой как РНКазы Н1 [19, 20].

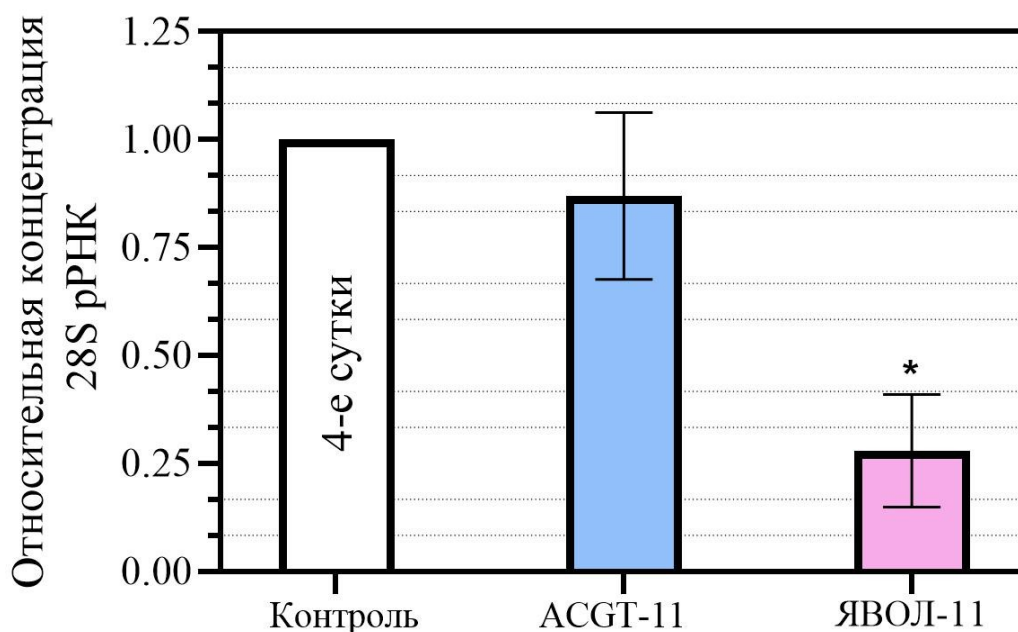


Рис. 2 Олионид ЯВОЛ-11 достоверно снижает концентрацию 28S рРНК на 4-е сутки после обработки. На графике представлены средние значения и стандартные ошибки средних для 3 повторностей по сравнению с контрольной группой, обработанной водой; контроль был принят за 1 (100%). Достоверность различий между группой "ЯВОЛ-11" и контрольной группой обозначена (*) при $p < 0,01$.

На четвертые сутки эксперимента наблюдалась картина, характерная для действия рекрутирующего рРНКазу антисмыслового олигонуклеотида ЯВОЛ-11, со снижением экспрессии целевой рРНК (2-й шаг механизма ДНКс) [13, 15]. Таким образом, были приведены доказательства того, что целевая 28S рРНК деградирует и что ЯВОЛ-11-фрагмент снижает ее концентрацию в качестве антисмыслового

олигонуклеотида, зависимого от рРНКазы [3,14]. Было также обнаружено заметное снижение (в 1,3 раза; $p > 0,05$) концентрации 28S рРНК у насекомых, в группе, контактно обработанных ACGT-11-фрагментом. Оценивая слегка повышенный уровень смертности личинок в группе обработанных "ACGT-11-фрагментом", было сделано предположение, что его последовательность может неспецифически регулировать концентрацию 28S рРНК. ACGT-11-фрагмент в своей конструкции содержит CpG мотивы, которые как известно, активируют врожденный иммунитет хозяина против летальных воздействий от широкого спектра патогенов [39]. Очевидно, CpG мотивы способны генерировать «неожиданные» эффекты [7] и не должны использоваться в качестве контроля; однако они расширяют наше понимание действия олигонуклеотидов на насекомое. В любом случае они не вызвали значительной гибели насекомых при использовании в составе случайного олигонуклеотида "ACGT-11".

Следует отметить, что олинциды могут быть разработаны с помощью программы DNAINsector (dnainsector.com) или вручную с использованием последовательностей рРНК вредителей, найденных в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Все эти характеристики делают олинциды «легкими инсектицидами», а метод «генетической застёжки-молнии» воспринимается как легко настраиваемый алгоритм для защиты растений. Более того, короткие последовательности обеспечивают преимущества с точки зрения более высокого выхода синтеза с использованием фосфорамидитного метода, что приводит к увеличению массы продукта и снижению производственных затрат. Олинциды действуют преимущественно как контактные, а не системные инсектициды. Несмотря на отсутствие выраженной системной активности, они высокоэффективны благодаря точному воздействию на важные последовательности рРНК вредителя, что в итоге приводит к его гибели [31]. Полученные данные свидетельствуют о том, что вредители не способны компенсировать последствия действия коротких олигонуклеотидных инсектицидов, что, по-видимому, приводит к истощению запасов АТФ и «киназной катастрофе», приводящей к гибели клетки [31]. Внедрение метода «генетической застёжки-молнии» на основе КВАДб в защиту растений может привести к созданию высокоадаптируемой платформы для разработки олигонуклеотидных инсектицидов в ответ на генетические изменения вредителей в процессе микроэволюции. Основная цель — сохранение урожайности сельскохозяйственных культур при минимизации воздействия на окружающую среду — остаётся центральной в этом подходе. Согласно нашим последним прогнозам, этот метод также экономически целесообразен для крупномасштабного внедрения в сельском хозяйстве. Химические инсектициды остаются доминирующими в борьбе с вредителями [40], и вредители постепенно вырабатывают устойчивость к ним, обусловленную естественным отбором посредством случайных мутаций; это вызывает серьёзную озабоченность с середины XX века [41, 42].

Выводы

В ходе исследования ЯВОЛ-11 показал высокую эффективность в борьбе с *C. japonicus*. Этот показатель составил $83,11 \pm 7,06\%$ на 10-е сутки. Избирательность олигонуклеотидного инсектицида была показана с использованием случайного олигонуклеотида АСТГ-11, который не оказал существенного инсектицидного эффекта на японскую восковую ложнощитовку. Экспериментальные результаты показывают селективность и эффективность программируемых олинцидов, предоставляющих уникальную платформу для создания хорошо адаптированных олигонуклеотидных инсектицидов на основе данных о последовательностях рДНК вредителей в GenBank

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Удивительно, что минималистский подход метода «генетической застёжки-молнии», короткая немодифицированная антисмысловая ДНК, растворенная в воде, является настолько мощной и экологичной инновацией против насекомых-вредителей из подотряда грудехоботных, предоставляя новые возможности для ДНК-программируемой защиты растений. В то время как сегодня общественное доверие к средствам борьбы с вредителями низкое, экологически чистые олинциды имеют шанс затмить старую традицию и создать новую, связанную с безопасностью агентов борьбы с вредителями. Мы находимся на пороге новой эры в разработке инсектицидов, когда средства борьбы можно конструировать подобно конструктору, собираемому из азотистых оснований и управляемому геномными последовательностями насекомых-вредителей. Олигонуклеотидные инсектициды начинают воплощать в жизнь 90-летнюю концепцию: создание высокоселективных, эффективных и структурно адаптируемых химических инсектицидов, способных идти в ногу с микроэволюцией популяций вредителей.

Благодарности

«Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-16-20070, <https://rscf.ru/project/25-16-20070/>».

Список литературы

1. Araújo M.F., Castanheira E.M.S., Sousa S.F. The Buzz on Insecticides: A Review of Uses, Molecular Structures, Targets, Ad-verse Effects, and Alternatives // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – P. 3641. DOI: 10.3390/molecules28083641
2. Bachellerie J.P., Cavaille J., Huttenhofer A. The expanding snoRNA world // *Biochimie*. – 2002. – Vol. 84. – P. 775-790. DOI: 10.1016/S0300-9084(02)01402-5
3. Bachellerie J.P., Cavaille J., Huttenhofer A. The expanding snoRNA world // *Biochimie*. – 2002. – Vol. 84. – P. 775-790. DOI: 10.1016/S0300-9084(02)01402-5
4. Belikova A., Zarytova V., Grineva N. Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues // *Tetrahedron Lett.* – 1967. – Vol. 37. – P. 3557-3562. DOI: 10.1016/S0040-4039(01)89794-X
5. Boukouvala M.C., Kavallieratos N.G., Skourti A., Pons X., Alonso C.L., Eizaguirre M., Fernandez E.B., Solera E.D., Fita S., Bohinc T., Trdan S., Agrafioti P., Athanassiou C.G. *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Erebidæ): current status of biology, ecology, and management in europe with notes from North America // *Insects*. – 2022. – Vol. 13. – P. 854. DOI: 10.3390/insects13090854
6. De Schutter K., Taning C.N.T., Van Daele L., Van Damme E.J.M., Dubrueel P., Smagghe G. RNAi-based biocontrol products: market status, regulatory aspects, and risk assessment // *Front Insect Sci.* – 2022. – Vol. 1. – P. 818037. DOI: 10.3389/finsc.2021.818037
7. Dias N., Stein C.A. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms // *Mol Cancer Ther.* – 2002. – Vol. 1. – P. 347-55.
8. Donis-Keller H. Site specific enzymatic cleavage of RNA // *Nucleic Acids Res.* – 1979. – Vol. 7. – P. 179-92. DOI: 10.1093/nar/7.1.179
9. Egli M., Manoharan M. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – Vol. 51. – P. 2529-73. DOI: 10.1093/nar/gkad067
10. Gal'chinsky N.V., Yatskova E.V., Novikov I.A., Sharmagiy A.K., Plugatar Y.V., Oberemok V.V. Mixed insect pest populations of Diaspididae species under control of oligonucleotide insecticides: 3'-end nucleotide matters // *Pesticide Biochem Physiol.* – 2024. – Vol. 200. – P. 105838. DOI: 10.1016/j.pestbp.2024.105838

11. Geary R.S., Henry S.P., Grillone L.R. Fomivirsen: clinical pharmacology and potential drug interactions // Clin Pharmacokinet. – 2002. – Vol. 41. – P. 255-60. DOI: 10.2165/00003088-200241040-00002
12. Guo Y., Ji N., Bai L., Ma J., Li Z. Aphid viruses: a brief view of a long history // Front Insect Sci. – 2022. – Vol. 2. – P. 846716. DOI: 10.3389/finsc.2022.846716
13. Keyel P.A. DNases in health and disease // Dev Biol. – 2017. – Vol. 429. – P. 1-11. DOI: 10.1016/j.ydbio.2017.06.028
14. Knorre D.G. Chemical instruments in modern biology (on the example of antisense effects on genetic structures) // Soros Educ J. – 1998. – Vol. 12. – P. 25-31.
15. Krieg A.M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects // Annual Review of Immunology. – 2002. – Vol. 20. – P. 709-760. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842
16. Kumar H., Verma S., Behera R.K., Chandel A., Sharma M., Sagar, D. DNA Insecticide: An Emerging Crop Protection Technology // Indian Journal of Entomology. – 2024. – Vol. 87(4). – P. 1-8. DOI: 10.55446/IJE.2024.2160
17. Lazarević-Pašti T., Milanković V., Tasić T., Petrović S., Leskovac A. With or Without You?-A Critical Review on Pesticides in Food // Foods. – 2025. – Vol. 14. – P. 1128. DOI: 10.3390/foods14071128
18. Lin M., Hu X., Chang S., Chang Y., Bian W., Hu R., Wang J., Zhu Q., Qiu J. Advances of antisense oligonucleotide technology in the treatment of hereditary neurodegenerative diseases // Evid Based Complement Alternat Med. – 2021. – Vol. 2021. – P. 6678422. DOI: 10.1155/2021/6678422
19. Oberemok V.V. Method of Elimination of Phyllophagous Insects from Order Lepidoptera // Ukraine Patent. – 2008. – No. 36445.
20. Oberemok V., Gal'chinsky N., Novikov I., Sharmagiy A., Yatskova E., Laikova E., Plugatar Y. Ribosomal RNA-Specific Antisense DNA and Double-Stranded DNA Trigger rRNA Biogenesis and Insecticidal Effects on the Insect Pest *Coccus hesperidum* // Int. J. Mol. Sci. – 2025. – Vol. 26. – P. 7530. DOI: 10.3390/ijms26157530
21. Oberemok V.V., Gal'chinsky N.V., Useinov R.Z., Novikov I.A., Puzanova Y.V., Filatov R.I., Kouakou N.J., Kouame K.F., Kra K.D., Laikova K.V. Four most pathogenic superfamilies of insect pests of suborder sternorrhyncha: invisible superplunderers of plant vitality // Insects. – 2023. – Vol. 14. – P. 462. DOI: 10.3390/insects14050462
22. Oberemok V., Laikova K., Ali J., Gal'chinsky N. CUADb-based oligonucleotide insecticides (contact unmodified antisense DNA biotechnology) vs. RNA biocontrols (double-stranded RNA technology): newly born fraternal twins in plant protection // biorXiv. – 2024. DOI: 10.1101/2024.03.13.584797
23. Oberemok V.V., Laikova K.V., Andreeva O.A., Gal'chinsky N.V. Biodegradation of insecticides: oligonucleotide insecticides and double-stranded RNA biocontrols paving the way for eco-innovation // Front Environ Sci. – 2024. – Vol. 12. – P. 1430170. DOI: 10.3389/fenvs.2024.1430170
24. Oberemok V.V., Laikova K.V., Andreeva O.A., Gal'chinsky N.V. Oligonucleotide insecticides and RNA-based insecticides: 16 years of experience in contact using of the next generation pest control agents // J Plant Dis Prot. – 2024. – Vol. 131. – P. 1837-1852. DOI: 10.1007/s41348-024-00949-3
25. Oberemok V.V., Laikova K.V., Gal'chinsky N.V. Contact unmodified antisense DNA (CUAD) biotechnology: list of pest species successfully targeted by oligonucleotide insecticides // Front Agron. – 2024. – Vol. 6. – P. 1415314. DOI: 10.3389/fagro.2024.1415314
26. Oberemok V.V., Laikova K.V., Gal'chinsky N.V., Useinov R.Z., Novikov I.A., Temirova Z.Z., Shumskykh M.N., Krasnodubets A.M., Repetskaya A.I., Dyadichev V.V.,

Fomochkina I.I., Bessalova E.Y., Makalish T.P., Gninenko Y.I., Kubyshkin A.V. DNA insecticide developed from the *Lymantria dispar* 5.8S ribosomal RNA gene provides a novel biotechnology for plant protection // Sci Rep. – 2019. Vol. 9(6197). – P. 1-10. DOI: 10.1038/s41598-019-42688-8

27. Oberemok V.V., Laikova K.V., Useinov R.Z., Gal'chinsky N.V., Novikov I.A., Yurchenko K.A., Volkov M.E., Gorlov M.V., Brailko V.A., Plugatar Y.V. Insecticidal activity of three 10–12 nucleotides long antisense sequences from 5.8S ribosomal RNA gene of gypsy moth *Lymantria dispar* L. against its larvae // J Plant Prot Res. – 2019. – Vol. 59. – P. 561-564. DOI: 10.24425/jppr.2019.131271

28. Oberemok V.V., Laikova K.V., Zaitsev A.S., Gushchin V.A., Skorokhod O.A. The RING for gypsy moth control: Topical application of fragment of its nuclear polyhedrosis virus anti-apoptosis gene as insecticide // Pestic Biochem Physiol. – 2016. – Vol. 131. – P. 32-39. DOI: 10.1016/j.pestbp.2016.01.006

29. Oberemok V.V., Laikova K.V., Zaitsev A.S., Shumskykh M.N., Kasich I.N., Gal'chinsky N.V., Bekirova V.V., Makarov V.V., Agranovsky A.A., Gushchin V.A., Zubarev I.V., Kubyshkin A.V., Fomochkina I.I., Gorlov M.V., Skorokhod O.A. 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 // Int J Mol Sci. – 2017. – Vol. 18. – P. 2446. DOI: 10.3390/ijms18112446

30. Oberemok V.V., Novikov I.A., Yatskova E.V., Bilyk A.I., Sharmagiy A.K., Gal'chinsky N.V. Potent and selective 'genetic zipper' method for DNA-programmable plant protection: innovative oligonucleotide insecticides against *Trioza alacris* Flor // Chem Biol Technol Agric. – 2024. – Vol. 11(144). – P. 1-8. DOI: 10.1186/s40538-024-00668-9

31. Oberemok V.V., Skorokhod O.A. Single-stranded DNA fragments of insect-specific nuclear polyhedrosis virus act as selective DNA insecticides for gypsy moth control // Pestic Biochem Physiol. – 2014 – Vol. 113. – P. 1-7. DOI: 10.1016/j.pestbp.2014.05.005

32. Oberemok V.V., Useinov R.Z., Skorokhod O.A., Gal'chinsky N.V., Novikov I.A., Makalish T.P., Yatskova E.V., Sharmagiy A.K., Golovkin I.O., Gninenko Y.I., Puzanova Y.V., Andreeva O.A., Alieva E.E., Eken E., Laikova K.V., Plugatar Y.V. Oligonucleotide insecticides for green agriculture: regulatory role of contact DNA in plant–insect interactions // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23. – P. 15681. DOI: 10.3390/ijms232415681

33. Oirdi M., Yaseen M., Farwa U., Raza M.A., Farhan M., Sandhu Z.A., Ali F., Khan H.S., Nahvi I. Crops and people: the dangers and potential benefits of pesticides // Cogent Food Agric. – 2024. – Vol. 10. DOI: 10.1080/23311932.2024.2334096

34. Patil V., Jangra S., Ghosh A. Advances in antisense oligo technology for sustainable crop protection. Crit Rev Plant Sci. – 2024. – P. 1-23. DOI: 10.1080/07352689.2024.2394001

35. Peng Y., Wang K., Fu W., Sheng C., Han Z. Biochemical comparison of dsRNA degrading nucleases in four different insects // Front Physiol. – 2018. – Vol. 9. – P. 624. DOI: 10.3389/fphys.2018.00624

36. Scherthaner J.P., Milne R.E., Kaplan H. Characterization of a novel insect digestive DNase with a highly alkaline pH optimum // Insect Biochem Mol Biol. – 2002. – Vol. 32. – P. 255-263. DOI: 10.1016/S0965-1748(01)00084-4

37. Skendžić S., Zovko M., Živković I.P., Lešić V., Lemić D. The Impact of Climate Change on Agricultural Insect Pests // Insects. – 2021. Vol. 12. – P. 440. DOI: 10.3390/insects12050440

38. Thakur S., Sinhari A., Jain P., Jadhav H.R. A perspective on oligonucleotide therapy: Approaches to patient customization // Front Pharmacol. – 2022. – Vol. 13. – P. 1006304. DOI: 10.3389/fphar.2022.1006304

39. Wang X.W., Blanc S. Insect transmission of plant single-stranded DNA viruses // *Annu Rev Entomol.* – 2021. – Vol. 66. – P. 389-405. DOI: 10.1146/annurev-ento-060920-094531
40. Wang Y., Zhang H., Li H., Miao X. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control // *PloS One.* – 2011. – Vol. 6. – P. e18644. DOI: 10.1371/journal.pone.0018644
41. Will C.L., Luhrmann R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function // *Curr Opin Cell Biol.* – 2001. – Vol. 13. – P. 290-301. DOI: 10.1016/S0955-0674(00)00211-8
42. Wu W., Shan H.W., Li J.M., Zhang C.X., Chen J.P., Mao Q. Roles of bacterial symbionts in transmission of plant virus by hemipteran vectors // *Front Microbiol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 805352. DOI: 10.3389/fmicb.2022.805352
43. Zamecnik P.C., Stephenson M.L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1978. – Vol. 75. – P. 280-284. DOI: 10.1073/pnas.75.1.280

Статья поступила в редакцию 05.08.2025 г.

Plugatar Yu.V., Gal'chinsky N.V., Yatskova E.V., Sharmagiy A.K., Oberemok V.V. Development and application of innovative oligonucleotide insecticide YAVOL-11 for control of *Ceroplastes japonicus* Green (suborder Sternorrhyncha) // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2025. – №156. – P. 7-17

Contact oligonucleotide insecticides (olinscides or DNA insecticides) based on the contact unmodified antisense DNA biotechnology (CUADb) platform, invented in 2008, have been significantly improved and rethought. CUADb (or the "genetic zipper" method) combines molecular genetics, bioinformatics and *in vitro* nucleic acid synthesis. A major paradigm shift was the demonstration that unmodified antisense DNA can act as a contact insecticide. Key breakthroughs included the identification of convenient target genes (rRNA genes), the mechanism of action (DNA containment) and the detection of sternorrhynchans insect pests highly susceptible to olinscides. This class of new generation insecticides creates opportunities for the development of insecticides intended for individual populations of insect pests. In this work, conducted on *Ceroplastes japonicus* Green larvae in open ground, the high potential of using olinscide YAVOL-11 (5'-CGACCGACGAA-3') in the fight against false scale insects and their potential as a replacement for non-selective organophosphorus insecticides is demonstrated.

Key words: *DNA insecticides; olinscides; contact unmodified antisense DNA biotechnology; CUADb; "genetic zipper" method*