

УДК 57.021:57.052:577.29

ПРИМЕНЕНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ СМЕШАННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ НАСЕКОМЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА DIASPIDIDAE

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

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

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

Diaspididae являются одними из самых серьезных мелких сокососущих насекомых с колюще-сосущим ротовым аппаратом и являются основными экономическими вредителями, поскольку они поражают и уничтожают многолетние декоративные растения и продовольственные культуры. Наши предыдущие работы показали, что олигонуклеотидные инсектициды (олинциды) высокоэффективны против щитовок. Более того, олинциды обладают доступностью, селективностью действия, быстрой биоразлагаемостью и низким углеродным следом. Популяции насекомых-вредителей подвергаются микроэволюции, и олинциды должны и способны учитывать проблему устойчивости к инсектицидам. Используя результаты секвенирования, было обнаружено, что в смешанных популяциях насекомых-вредителей *Dynaspidotus britannicus* Newstead и *Aonidia lauri* Bouche преобладает популяция *Aonidia lauri* Bouche. Особи *Aonidia lauri* Bouche составляли 80% с последовательностью 5'-ATCGTTGGCAT-3' в участке 28S рРНК, а 20% популяции составляли особи *Dynaspidotus britannicus* Newstead с последовательностью 5'-ATCGTCGGTAT-3'. Мы создали олинциды Диасп₈₀-11 (5'-ATGCCAACGAT-3') и Диасп₂₀-11 (5'-ATACCGACGAT-3') с идеальной комплементарностью к каждой из последовательностей. Смертность насекомых на 14-е сутки составила 98,19±3,12% в группе Диасп₈₀-11, 64,66±0,67% в группе Диасп₂₀-11 и 3,77±0,94% в контрольной группе.

Ключевые слова: *Dynaspidotus britannicus* Newstead; *Aonidia lauri* Bouche; олинциды; ДНК-инсектициды; рибосомальная РНК; контактная немодифицированная антисмысловая ДНК

Введение

Пол Замечник и Мэри Стэфенсон были первыми, кто успешно применил концепцию антисмысловых олигонуклеотидов в 1978 г. [1]. Для этой цели они использовали специфический 13-нуклеотидный антисмысловый ДНК-фрагмент для ингибирования репликации вируса саркомы Рауса и трансформации клеток в куриных эмбрионах. Авторы использовали олигонуклеотид с модификациями на 3' и 5'-концах, что уменьшило его деградацию клеточными нуклеазами. Год спустя, в 1979 г., Донис-Келлер представила результаты, показывающие, что РНКазы Н расщепляют цепь РНК в гетеродуплексах РНК-ДНК сайт-специфическим образом [2]. В настоящее время модифицированные олигонуклеотиды используются во всех приложениях антисмысловой технологии, за исключением олигонуклеотидных инсектицидов [3]. Таким образом, исторически способ действия немодифицированной антисмысловой ДНК и ее потенциальное применение не были подробно исследованы. Более того, в 2002 г., Диас и Стайн подчеркнули, что немодифицированные (фосфодиэфирные) олигонуклеотиды не следует использовать в экспериментах из-за их токсического действия на клетки [4]. Это происходит потому, что немодифицированные олигонуклеотиды быстро разрушаются эндонуклеазами и экзонуклеазами, обычно в

направлении от 3' к 5', и образуются дезоксирибонуклеозид-5'-фосфаты, которые оказывают цитотоксическое и антипролиферативное действие. Также вполне может быть правдой, что ученые в какой-то момент времени решили не следовать по пути тщательного изучения действия немодифицированных антисмысловых олигонуклеотидов на клетки, включая клетки насекомых, хотя немодифицированная ДНК является природным полимером с перспективными характеристиками для использования в защите растений. В серии длительных и кропотливых экспериментов нами показано, что немодифицированные антисмысловые олигонуклеотиды проникают в клетки насекомых через их покровы [5] и влияют на экспрессию целевого гена через механизм действия антисмысловых олигонуклеотидов с участием РНКазы H, в большинстве случаев снижая экспрессию целевого гена [3-9]. В наших экспериментах впервые был поставлен знак равенства между антисмысловыми олигодезоксирибонуклеотидами и контактными инсектицидами, а также была предложена концепция защиты растений на основе немодифицированных антисмысловых олигонуклеотидов [10].

Идея олигонуклеотидных инсектицидов была предложена на непарном шелкопряде *Lymantria dispar* L. [10] и постепенно распространилась на полужесткокрылых насекомых, показав лучший ответ у видов подотряда Грудехоботные (Hemiptera) [11]. В наших недавних исследованиях мы показали, что олинциды с полной комплементарностью целевой последовательности рибосомальной РНК (рРНК) являются высокоэффективными, вызывающими смертность насекомых подотряда Грудехоботные [11], включая *Dynaspidiotus britannicus* Newstead [7], *Unaspis euonymi* Comstock [7], *Ceroplastes japonicus* Green [8], *Coccus hesperidum* L. [12], *Icerya purchasi* Maskell [9] и *Macrosiphoniella sanborni* Gillette [13]. В последнее время КВАД-биотехнология (контактно вводимая антисмысловая ДНК), основанная на антисмысловых олигонуклеотидах, приобрела популярность и распространение в защите растений. Например, были разработки с использованием нашего подхода в защите растений на основе модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов, называемых 2'-дезоксид-2'-фтор-D-арабинонуклеиновой кислотой (FANA), для подавления двух бактериальных инфекций растений *Candidatus Liberibacter asiaticus*, CLas (цитрусовые деревья), и *C. Liberibacter solanacearum*, CLso (картофель и томаты) [14, 15].

В данной статье мы исследуем эффективность контактных олинцидов в полевых условиях со смешанными популяциями насекомых *D. britannicus* и *Aonidia lauri* и оцениваем значимость замен отдельных нуклеотидов на 3'-конце, 5'-конце и 6-м положении нуклеотида в олинциде для его эффективности.

Объекты и методы исследования

Исследования проводились в период с апреля 2022 г. по июль 2023 г. в Никитском ботаническом саду в Крыму, недалеко от Ялты, на берегу Черного моря (координаты: 44°30'41.9"N и 34°13'57.3"E). *D. britannicus* и *A. lauri* были обнаружены и идентифицированы на деревьях *Laurus nobilis* L. (Laurales: Lauraceae). Небольшие деревья лавра были рандомизированы; для каждой экспериментальной группы было взято по 3 дерева. Мы провели три независимых полевых эксперимента.

Мы использовали GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), для разработки олинцидов для экспериментов (Диасп₂₀₋₁₁ для контроля *D. britannicus*, 5'-ATACCGACGAT-3', GenBank: KY219375.1; Диасп₈₀₋₁₁ для контроля *A. lauri*, 5'-ATGCCAACGAT-3', GenBank: KY219724.1). Каждая последовательность была синтезирована на ДНК-синтезаторе ASM800ET DNA synthesizer (BIOSSET, Новосибирск, Россия). Затем их использовали в качестве контактного олинцида,

растворенного в воде (свободная от нуклеаз, РНКаз и ДНКаз) в концентрации 100 нг/мкл и нанесенных с помощью ручного распылителя на листья *L. nobilis* (мг олинцида на м² листьев), 10 мл раствора использовали на м². В качестве контроля использовали группу, обработанную водой. Около 8100 насекомых первого и второго личиночного возраста были обработаны в трех независимых экспериментах, и их показатели выживаемости были рассчитаны статистически. Личинки были подсчитаны на 40 листьях *L. nobilis*, собранных случайным образом с разных сторон дерева, в каждой повторности каждого экспериментального варианта. Смертность регистрировали и рассчитывали на 3-е, 7-е, 10-е и 14-е сутки путем деления количества погибших особей на общее количество особей на листе и умножения на 100%.

Для определения качества полученных олигонуклеотидов использовался анализатор VastoSCREEN на базе масс-спектрометра MALDI-TOF (Litech, Москва, Россия). Отношение массы к заряду (m/z) олигонуклеотидов измерялось в виде положительных ионов с 3-гидроксипиколиновой кислотой в качестве матрицы на приборе LaserToFLT2 Plus (Великобритания) в соотношении 2:1. Теоретическое отношение m/z рассчитывалось с помощью программного обеспечения ChemDraw 18.0 (ChemDraw, CambridgeSoft, США) и не отличалось более чем на 10 единиц от полученного отношения m/z (табл. 1).

Таблица 1

Результаты анализа синтезированных олигонуклеотидов методом MALDI-TOF

Олигонуклеотид	Теоретическое соотношение m/z	Практическое соотношение m/z
Диасп ₈₀ -11	3329,77	3324,61
Диасп ₂₀ -11	3326,01	3327,51
Диасп ₂₀ (5')-11	3311,86	3315,60
Диасп ₂₀ (6)-11	3279,28	3284,61
Диасп ₂₀ (3')-11	3337,36	3333,63
Диасп28S-F, ген 28S рРНК, прямой праймер	5473,01	5466,96
Диасп28S-R, ген 28S рРНК, обратный праймер	5450,09	5442,95

Для сравнения эффективности олинцидов Диасп₂₀-11 и Диасп₈₀-11 на смешанных популяциях *D. britannicus* и *A. lauri* с эффективностью коммерчески доступного химического инсектицида в качестве стандарта использовался инсектицид тиаметоксам ((EZ)-3-(2-хлор-1,3-тиазол-5-илметил)-5-метил-1,3,5-окса-дiazинан-4-илиден(нитро)амин (Международный союз теоретической и прикладной химии [ИЮПАК]); IRAC МоА 4 А неоникотиноидная группа; Actara[®] 25 WG; 0,8 г/л; Syngenta[®], Вена, Австрия). Использовался ручной опрыскиватель и объем раствора 10 мл на м² листьев растений.

Образцы тканей насекомых (30-40 мг; 1500-2000 особей) гомогенизировали в лизирующем буфере (0,5 мл) перед экстракцией с помощью коммерческих наборов. Использовали прибор MagNA Lyser с системой гомогенизации MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics GmbH, Германия) (5500 об/мин, 10 сек.). После гомогенизации РНК экстрагировали с помощью набора MagNA Pure Compact RNA Isolation (Tissue) (Roche Diagnostics GmbH, Мангейм, Германия).

Оценку качества выделенной РНК проводили на агарозном геле. 0,5 мкг выделенной РНК оценивались на 1,8% агарозном геле и окрашивались бромистым этидием (1%). Электрофорез проводился в буфере ТВЕ (Трис-борат-ЭДТА) (10 В/см) в течение 40 мин. Все экспериментальные группы имели одинаковое количество,

интенсивность и рисунок полос РНК, что подтверждает качество и воспроизводимость выделения РНК из материала насекомых. Кроме того, мы использовали электрофорез для оценки качества продуктов реакции ПЦР. Проверялись количество и чистота РНК. Аликвоту РНК оценивали путем измерения поглощения при 260 нм и 280 нм в Nano-Drop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Концентрация РНК составляла 50 нг/мкл с соотношением A260/280 равным 1,8. Соотношение показаний при 260 нм и 280 нм (R260/280) дало оценку чистоты РНК [16]. Образцы РНК были разбавлены в деионизированной воде Milli-Q (Millipore, Мольсайд, Франция).

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили с флуоресцентным красителем SYBR Green. Fast-Start SYBR Green Master Mix (Roche, Базель, Швейцария) использовали в соответствии с инструкциями производителя. В системе SYBR Green кДНК (2 мкл) добавляли к смеси с набором FastStart SYBR Green MasterMix (Roche, Базель, Швейцария) и специфические праймеры (табл. 2) для *D. britannicus* и *A. lauri* использовали для количественного определения 28S рРНК. Была применена следующая программа ПЦР: 10 мин. начальной денатурации при 95°C, затем 30 циклов с 10 сек. денатурации при 95°C, 15 сек. отжига при 58°C и 20 сек. удлинения при 72°C были использованы для амплификации на системе ПЦР в реальном времени LightCycler® 96 (Roche, Базель, Швейцария). Для каждого условия ПЦР была выполнена в трех повторностях. Наконец, все продукты ПЦР были расплавлены для определения специфичности амплификации и наличия дополнительных продуктов.

Таблица 2

Последовательности праймеров для ПЦР-РВ с системой SYBR Green

Мишень	Праймер	Последовательность праймеров (5' -3')	Ампликон	ID последовательность в GenBank
28S рРНК	Диасп28S-F	CGAAACCCGTACATGTCG	127 п.н.	KY219375.1
	Диасп28S-R	CGACGGGCCCGTTGAGAC		KY219724.1

Тотальную РНК выделяли из личинок с помощью набора для выделения РНК (Евроген, Москва, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Набор MMLV RT использовался для проведения синтеза первой цепи кДНК (Евроген, Москва, Россия) в соответствии с протоколами производителя. Праймеры: прямой 5'-CGAAACCCGTACATGTCG-3' и обратный 5'-CGACGGGCCCGTTGAGAC-3' – использовались для количественных исследований методом ПЦР в реальном времени. Реакции ПЦР проводились на 2 мкл кДНК с использованием 7 мкл FastStart SYBRGreen Master Mix (Roche, Базель, Швейцария), 2 мкл H₂O (свободна от нуклеаз, РНКаз и ДНКаз) (Roche, Базель, Швейцария) и 0,5 мкл (80 нг/мкл) каждого праймера. ДНК сначала денатурировали в течение 4 мин. при 95°C, затем 30 циклов по 1 мин. денатурации при 94°C, 1 мин. гибридизации при 58°C и 1 мин. элонгации при 72°C, после чего следовал заключительный этап элонгации при 72°C в течение 7 мин. Продукты ПЦР из личинок очищали с помощью Cleanup S-Cap (Евроген, Москва, Россия), а полимеразную реакцию секвенирования проводили с помощью BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems, Вильнюс, Литва). Полимеразные реакции проводили с использованием 2 мкл очищенной ДНК и 2 мкл праймеров (12,8 нг/мкл). ДНК первоначально денатурировали в течение 1 мин. при 96°C, затем 30 циклов по 10 сек. денатурации при 96°C, 5 сек. гибридизации при 50°C и 4 мин. элонгации при 60°C. Ампликоны секвенировали в обоих направлениях с использованием капиллярного ДНК-секвенатора NANOPHOR-05 (Синтол, Москва,

Россия). Последовательности ДНК анализировали с использованием программы ClustalW 2.0.3 [17] и BLAST.

Стандартная ошибка среднего (SE) определялась и анализировалась с использованием t-критерия Стьюдента для статистического анализа, чтобы оценить значимость разницы в смертности и концентрации 28S рРНК между контрольной и экспериментальной группами на 3-е, 5-е, 7-е, 10-е и 14-е сутки. Непараметрический критерий хи-квадрат Пирсона (χ^2) с поправкой Йетса был применен для определения того, была ли значимая разница в средних значениях групп. Все вышеупомянутые расчеты были выполнены с использованием программного обеспечения Prism 9 (GraphPad Software Inc., Бостон, США).

Результаты и обсуждение

Дизайн олигонуклеотидов

Мы выбрали последовательности из генетической базы данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) для создания олинцидов. Поскольку у нас была смешанная популяция насекомых-вредителей (*A. lauri* и *D. britannicus*), наше внимание привлек фрагмент последовательности 28S рРНК, где они различались. Затем мы решили проверить, существуют ли данные генетические различия в нашей смешанной популяции насекомых-вредителей в полевых условиях. Мы проверили, и она совпала (рис. 1).

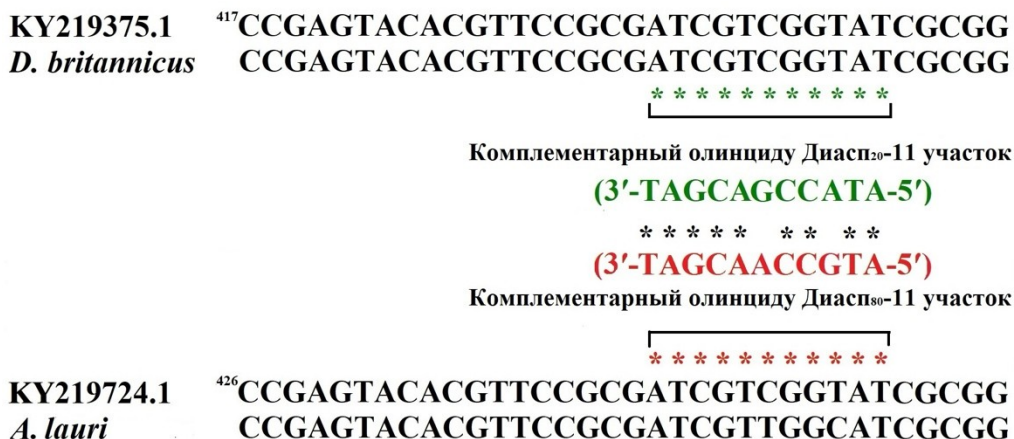


Рис. 1 Выравнивание секвенированных ДНК-фрагментов насекомых-вредителей (*Dynaspidiotus britannicus* Newstead и *Aonidia lauri* Bouche, собранных в природе) и фрагмента гена 28S рРНК (из GenBank), выполненное с использованием ClustalW 2.0.3.

Смертность смешанных популяций насекомых-вредителей *D. britannicus* и *A. lauri* после обработки олинцидами в естественной среде обитания.

В смешанных популяциях насекомых-вредителей *D. britannicus* и *A. lauri* результаты секвенирования показали, что особи *A. lauri* с последовательностью 5'-ATCGTTGGCAT-3' в участке 28S рРНК составляли 80% особей смешанных популяций, а 20% популяции составляли особи *D. britannicus* с последовательностью 5'-ATCGTCGGTAT-3'. На основе этих знаний мы создали олинциды Диасп₈₀-11 (5'-ATGCCAACGAT-3', против *A. lauri*) и Диасп₂₀-11 (5'-ATACCGACGAT-3', против *D. britannicus*) с совершенной комплементарностью к каждой из последовательностей. Также мы решили сделать замены отдельных нуклеотидов в олинциде Диасп₂₀-11, чтобы понять, какой нуклеотид будет играть наиболее важную роль в инсектицидном эффекте. Мы создали три последовательности с заменами отдельных нуклеотидов, трансверсии на 5'-конце – Диасп₂₀(5')-11 (А на Т), на 3'-конце – Диасп₂₀(3')-11 (Т на А)

и в середине последовательности – Диасп₂₀(6)-11 (6-е азотистое основание последовательности; G на C) соответственно.

На 7-е сутки после обработки личинок олигонуклеотидными инсектицидами достоверное увеличение смертности насекомых по сравнению с контролем (вода) было обнаружено в группах опыта: Диасп₈₀-11 ($\chi^2 = 166,495$, $p < 0,001$, $N = 444$, $df = 1$), Диасп₂₀-11 ($\chi^2 = 175,209$, $p < 0,001$, $N = 727$, $df = 1$), Диасп₂₀(5')-11 ($\chi^2 = 111,713$, $p < 0,001$, $N = 648$, $df = 1$), Диасп₂₀(6)-11 ($\chi^2 = 55,421$, $p < 0,001$, $N = 668$, $df = 1$), Диасп₂₀(3')-11 ($\chi^2 = 53,181$, $p < 0,001$, $N = 695$, $df = 1$) и тиаметоксам ($\chi^2 = 390,174$, $p < 0,001$, $N = 641$, $df = 1$). В среднем на 7-е сутки погибло $3,38 \pm 0,22$ %, $64,64 \pm 1,75$ %, $51,59 \pm 13,87$ %, $30,76 \pm 2,91$ %, $25,86 \pm 5,83$ %, $23,47 \pm 0,29$ % и $81,90 \pm 4,30$ % личинок в группах, обработанных водой (контроль), Диасп₈₀-11, Диасп₂₀-11, Диасп₂₀(5')-11, Диасп₂₀(6)-11, Диасп₂₀(3')-11 и тиаметоксам, соответственно (рис. 2).

На 14-е сутки эксперимента смертность в группах опыта увеличилась и достигла в контроле $3,77 \pm 0,94$ %, в Диасп₈₀-11 – $98,19 \pm 3,12$ % ($\chi^2 = 317,645$, $p < 0,001$, $N = 420$, $df = 1$), в Диасп₂₀-11 – $64,66 \pm 0,67$ % ($\chi^2 = 216,170$, $p < 0,001$, $N = 623$, $df = 1$), в Диасп₂₀(5')-11 – $53,89 \pm 7,25$ % ($\chi^2 = 146,703$, $p < 0,001$, $N = 661$, $df = 1$), $40,68 \pm 4,33$ % в Диасп₂₀(6)-11 ($\chi^2 = 132,319$, $p < 0,001$, $N = 606$, $df = 1$), $35,74 \pm 5,51$ % в Диасп₂₀(3')-11 ($\chi^2 = 80,965$, $p < 0,001$, $N = 683$, $df = 1$) и $89,85 \pm 5,57$ % в группе с тиаметоксамом ($\chi^2 = 424,328$, $p < 0,001$, $N = 611$, $df = 1$).

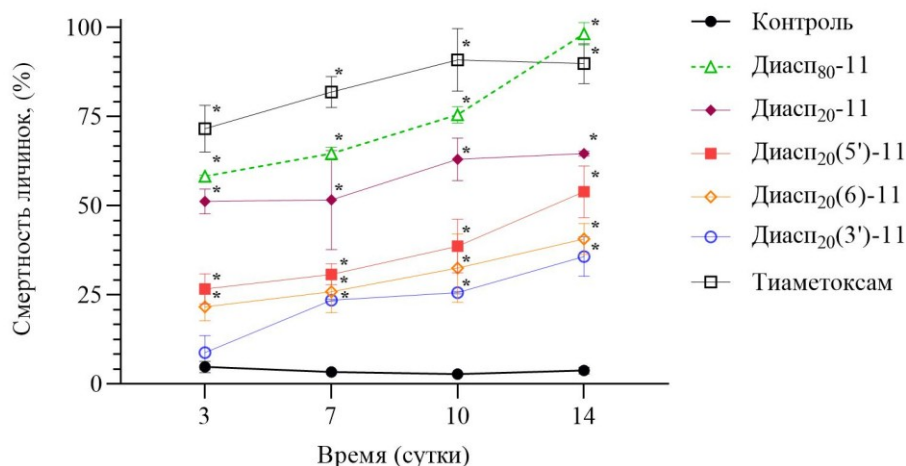


Рис. 2 Динамика смертности смешанной популяции (80%:20%) *Dynaspidiotus britannicus* Newstead и *Aonidia lauri* Bouche после контактной обработки водой (контроль), Диасп₈₀-11, Диасп₂₀-11, Диасп₂₀(5')-11, Диасп₂₀(6)-11, Диасп₂₀(3')-11 и тиаметоксамом. Значимость различий в группах по сравнению с контролем обозначена * при $p < 0,05$.

Олинцид Диасп₈₀-11 показал существенную эффективность по сравнению с тиаметоксамом. Так, замена азотистого основания в последовательности олигонуклеотидного инсектицида Диасп₂₀-11 на 5'-конце приводит к снижению его эффективности на 17%, а на 3'-конце – на 45%. Замена азотистого основания в 6-й позиции снизила эффективность на 37%.

Следует отметить, что на основании полученных данных мы видим, что смертность насекомых снижается в ряду Диасп₈₀-11 > Диасп₂₀-11 > Диасп₂₀(5')-11 > Диасп₂₀(6)-11 > Диасп₂₀(3')-11 и эта тенденция сохраняется на протяжении всего эксперимента (2 недели). Поскольку Диасп₈₀-11 и Диасп₂₀-11 вызывают перекрестную смертность для *D. britannicus* (Диасп₈₀-11) и *A. lauri* (Диасп₂₀-11), мы предполагаем, что между ДНК-олинцидами и несовершенными участками 28S рРНК нецелевых насекомых-вредителей может происходить неканоническое спаривание оснований,

аналогичное известным явлениям взаимодействия миРНК и мРНК, включая несовпадения А:С (С:А) и G:U (U:G). В частности, известно, что обнаруженные в нашем случае несовпадения А:С (С:А) хорошо переносятся и подавляются почти так же эффективно, как и их комплементарные (канонические спаривания) аналоги [18]. Более того, также обнаруженное в нашем случае несовпадение G:Т (Т:G), очевидно, может играть важную роль в деградации целевой РНК, поскольку пары оснований, возможно, должны «дышать», чтобы произошло расщепление [19]. Определенно, неканоническое спаривание оснований следует учитывать при дизайне олинцидов. Учитывая природное происхождение олинцидов, этот подход может быть экологически чистой заменой неоникотиноидов и других неселективных химических инсектицидов.

Олинциды значительно снижают концентрацию 28S рРНК в личинках *Diaspididae*.

Так как снижение экспрессии целевого гена является золотым стандартом для доказательства специфичности действия [4] для антисмысловых олигонуклеотидов. Мы также оценили относительную концентрацию 28S рРНК в смешанных популяциях личинок (*D. britannicus* и *A. lauri*) после обработки, что очень близко отражало результаты по смертности. В ходе исследований мы обнаружили, что олигонуклеотидные инсектициды действуют через механизм ДНК сдерживания (ДНКс), который состоит из двух этапов. На первом этапе ДНКс антисмысловой ДНК-олигонуклеотид (олигонуклеотидный инсектицид) комплементарно взаимодействует с целевой рРНК (другими словами, «арестовывает» целевую рРНК) и мешает нормальному функционированию и биогенезу рибосом («арестованные» рибосомы); этот процесс сопровождается существенной смертностью насекомых-вредителей. После этого мы видим гиперкомпенсацию целевой рРНК ДНК-зависимой РНК-полимеразой как единственный способ для клетки насекомого бороться за жизнь в такой ситуации, когда целевые рРНК и/или полицистронные рРНК (пре-рРНК) транскрипты «арестованы» антисмысловыми ДНК-олигонуклеотидами.

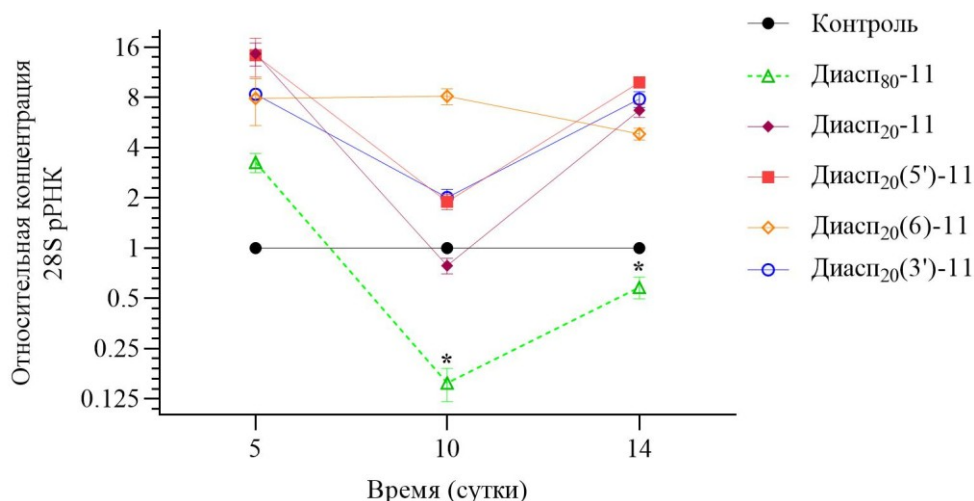


Рис. 3 Динамика относительной концентрации 28S рРНК (средняя концентрация) в смешанных популяциях насекомых-вредителей (*Dynaspidiotus britannicus* Newstead и *Aonidia lauri* Bouche) на 5-е, 10-е и 14-е сутки после обработки олигонуклеотидами Диасп₈₀-11, Диасп₂₀-11, Диасп₂₀(5')-11, Диасп₂₀(6)-11 и Диасп₂₀(3')-11. Контроль принят за 1 (100%). Значимость различий в группе Диасп₈₀-11 по сравнению с контрольной группой обозначена * при $p < 0,05$; средняя относительная концентрация означает, что в исследуемой массе насекомых есть особи с более низкой и более высокой концентрацией целевой рРНК по сравнению со средним значением.

На втором этапе РНКазы Н расщепляет целевую рРНК, и происходит существенное снижение ее концентрации; этот этап также сопровождается существенной смертностью насекомых-вредителей. На 5-е сутки во всех группах наблюдалось значительное увеличение концентрации целевой 28S рРНК, что согласуется с данными нашей предыдущей работы [12], а затем снижение концентрации 28S рРНК, характерное для антисмысловых олигонуклеотидов [4], наблюдалось на 10-е сутки по сравнению с 5-ми сутками (рис. 3). Существенное снижение концентрации между 5-ми и 10-ми сутками выстроилось в почти тот же ряд, что и для смертности: Диасп₈₀-11 > Диасп₂₀-11 > Диасп₂₀(5')-11 > Диасп₂₀(3')-11 > Диасп₂₀(6)-11. Наиболее значительное снижение концентрации 28S рРНК у насекомых было обнаружено для фрагмента Диасп₈₀-11 и было в $8,44 \pm 0,14$ и $1,72 \pm 0,36$ раза ниже по сравнению с контролем, обработанным водой, на 10-е и 14-е сутки соответственно ($p < 0,05$, рис. 3).

Заключение

Мы разработали эффективный олинцид Диасп₈₀-11 для контроля смешанных популяций насекомых-вредителей видов Diaspididae (*A. lauri* и *D. britannicus*). В этой статье мы впервые показали эффективность олинцида против *A. lauri*. Мы также показали, что комплементарность 3'-концевого нуклеотида к целевой 28S рРНК была наиболее важной для выраженного инсектицидного эффекта (значимость нуклеотидов для инсектицидного эффекта: 5' <(6) <3'). Подводя итог работы, можно сказать, что использование олинцидов также может решить или, по крайней мере, улучшить фундаментальную проблему селективности инсектицидов. Результаты этой работы показали, что замена всего одного нуклеотида в 1-й (5'-конец), 6-й и 11-й (3'-конец) позициях приводит к снижению биологической эффективности целевого олинцида. Особенно важна необходимость полной комплементарности 3'-концевого нуклеотида для обеспечения максимальной инсектицидной эффективности олигонуклеотидного инсектицида. Полученные данные дополняют имеющиеся знания по использованию олигонуклеотидных последовательностей в качестве олигонуклеотидных инсектицидов и открывают новые горизонты для дальнейших исследований и применения КВАД-биотехнологии.

Благодарности

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

Список литературы

1. 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.
2. Donis-Keller H. Site specific enzymatic cleavage of RNA // Nucleic Acids Res. – 1979. – Vol. 7(1). – p. 179-192.
3. 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. – p. 6197.
4. Dias N., Stein C.A. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms // Mol. Cancer Ther. – 2002. – Vol. 1. – p. 347-355.
5. 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 Protect. Res. – 2019. – Vol. 59(4). – p. 561-564.

6. 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., Kubyshev 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.

7. Gal'chinsky N., Useinov R., Yatskova E., Laikova K., Novikov I., Gorlov M., Trikoz N., Sharmagiy A., Plugatar Y., Oberemok V. A breakthrough in the efficiency of contact DNA insecticides: rapid high mortality rates in the sap-sucking insects *Dynaspidiotus britannicus* Comstock and *Unaspis euonymi* Newstead // J. Plant Prot. Res. – 2020. – Vol. 60. – p. 220-223. DOI: <https://doi.org/10.24425/jppr.2020.133315>.

8. Useinov R.Z., Gal'chinsky N.V., Yatskova E.V., Novikov I.A., Puzanova Y.V., Trikoz N.N., Sharmagiy A.K., Plugatar Y., Laikova K., Oberemok V.V. To bee or not to bee: creating DNA insecticides to replace non-selective organophosphate insecticides for use against the soft scale insect *Ceroplastes japonicus* green // J. Plant Prot. Res. – 2020. – Vol. 60. – p. 406-409. DOI: <https://doi.org/10.24425/jppr.2020.133956>.

9. Gal'chinsky N.V., Yatskova E.V., Novikov I.A., Useinov R.Z., Kouakou N.J., Kouame K.F., Kra K.D., Sharmagiy A.K., Plugatar Y.V., Laikova K.V., Oberemok V.V. *Icerya purchasi* Maskell (Hemiptera: Monophlebidae) control using low carbon footprint oligonucleotide insecticides // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – Vol. 24. – p. 11650. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241411650>.

10. Oberemok V.V. Ukrainian Patent Application. – 2008. – No. 36445.

11. 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: <https://doi.org/10.3390/insects14050462>.

12. 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: <https://doi.org/10.3390/ijms232415681>.

13. Puzanova Y.V., Novikov I.A., Bilyk A.I., Sharmagiy A.K., Plugatar Y.V., Oberemok V.V. Perfect complementarity mechanism for aphid control: oligonucleotide insecticide Macsan-11 selectively causes high mortality rate for *Macrosiphoniella sanborni* Gillette // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – Vol. 24. – p. 11690. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241411690>.

14. Hunter W.B., Cooper W.R., Sandoval-Mojica A.F., McCollum G., Aishwarya V., Pelz-Stelinski K.S. Improving suppression of hemipteran vectors and bacterial pathogens of Citrus and Solanaceous plants: advances in antisense oligonucleotides (FANA) // Front. Agron. – 2021. – Vol. 3. – p. 675247. DOI: <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.675247>.

15. Sandoval-Mojica A.F., Hunter W.B., Aishwarya V., Bonilla S., Pelz-Stelinski K.S. Antibacterial FANA oligonucleotides as a novel approach for managing the Huanglongbing pathosystem // Sci. Rep. – 2021. – Vol. 11. – p. 2760. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82425-8>.

16. Okamoto T., Okabe S. Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution // Int. J. Mol. Med. – 2000. – Vol. 5. – p. 657-659.

17. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22. – p. 4673-4680. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.

18. Du Q., Thonberg H., Wang J., Wahlestedt C., Liang Z. A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – Vol. 33(5). – p. 1671-1677. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gki312>.

19. Luige O, Karalé K, Bose PP, Bollmark M, Tedebark U, Murtola M, Strömberg R. Influence of sequence variation on the RNA cleavage activity of Zn²⁺–dimethyl-dppz-PNA-based artificial enzymes // *RSC Adv.* – 2022. – Vol. 22. – p. 5398-5406. DOI: <https://doi.org/10.1039/d1ra08319h>.

Статья поступила в редакцию 05.06.2024 г.

Gal'chinsky N.V., Yatskova E.V., Sharmagiy A.K., Plugatar Yu.V., Oberemok V.V. The use of oligonucleotide insecticides for the control of mixed populations of insect pests of Diaspididae family // *Bull. of the State Nikita Botan. Gard.* – 2025. – № 154. – P. 95-104

Diaspididae are one of the most serious small herbivorous insects with piercing–sucking mouth parts and are major economic pests as they attack and destroy perennial ornamentals and food crops. Our previous work showed that green oligonucleotide insecticides (olinscides) are highly effective against scale insects. Moreover, olinscides possess affordability, selectivity in action, fast biodegradability, and a low carbon footprint. Insect pest populations undergo microevolution and olinscides should and are able to take into account the problem of insecticide resistance. Using sequencing results, it was found that in the mixed populations of insect pests *Dynaspidotus britannicus* Newstead and *Aonidia lauri* Bouche, predominates the population of *A. lauri*. Individuals of *A. lauri* comprised for 80 % of individuals with the sequence 5'-ATCGTTGGCAT-3' in the 28S rRNA site, and 20 % of the population comprised *D. britannicus* individuals with the sequence 5'-ATCGTCGGTAT-3'. We created olinscides Diasp₈₀-11 (5'-ATGCCAACGAT-3') and Diasp₂₀-11 (5'-ATACCGACGAT-3') with perfect complementarity to each of the sequences. Mortality of insects on the 14th day comprised 98.19 ± 3.12 % in Diasp₈₀-11 group, 64.66 ± 0.67 % in Diasp₂₀-11 group, and 3.77 ± 0.94 % in the control group.

Key words: *Dynaspidotus britannicus* Newstead; *Aonidia lauri* Bouche; olinscides; DNA-insecticides; ribosomal RNA; contact unmodified antisense DNA