

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений”
(ФГБНУ ВИЗР)

All-Russian Institute of Plant Protection

ISSN 1727-1320 (Print),
ISSN 2308-6459 (Online)

В Е С Т Н И К ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2022 TOM 105 ВЫПУСК 1
 VOLUME ISSUE

Санкт-Петербург
St. Petersburg, Russia
2022

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Научно-теоретический рецензируемый журнал

Основан в 1939 г.

Издание возобновлено в 1999 г.

Учредитель: Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (ВИЗР)

Зарегистрирован в ГК РФ по печати № 017839 от 03 июля 1998 г.

Главный редактор: В.А. Павлюшин

Зам. гл. редактора: В.И. Долженко, Ю.С. Токарев

Ответственный секретарь: В.К. Моисеева

Технический секретарь: С.Г. Удалов

Корректоры англоязычных текстов: Ю.С. Токарев, Ю.Я. Соколова

Технический помощник: А.Г. Конончук

Журнал «Вестник защиты растений» (ISSN: 1727-1320) включен в «Перечень изданий ВАК РФ» по следующим научным специальностям и отраслям науки:

1.5.14 – Энтомология (биологические науки),

1.5.18 – Микология (биологические науки),

4.1.1 – Общее земледелие. Растениеводство (сельскохозяйственные и биологические науки),

4.1.2 – Селекция, семеноводство и биотехнология растений (сельскохозяйственные и биологические науки),

4.1.3 – Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений (сельскохозяйственные и биологические науки),

4.1.4 – Садоводство, овощеводство, виноградарство и лекарственные культуры (сельскохозяйственные и биологические науки)

Индексируется в РИНЦ, CrossRef, ROAD и Sherpa/Romeo

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Афанасенко О.С., дбн, академик РАН, ВИЗР

Белюсов И.А., кбн, ВИЗР

Белякова Н.А., кбн, ВИЗР

Власенко А.Н., дсxn, академик РАН,

СибНИИЗиХ СФНЦА РАН

Власов Д.Ю., дбн, СПбГУ

Ганнибал Ф.Б., кбн, ВИЗР

Гончаров Н.Р., ксxn, ВИЗР

Гричанов И.Я., дбн, ВИЗР

Дзянь Синьфу, профессор, КНР

Долженко В.И., дсxn, академик РАН, ВИЗР

Егоров Е.А., дэн, академик РАН, СКФНЦСиВ

Захаренко В.А., дсxn, академик РАН, МНИИСХ

Игнатов А.Н., дбн, РУДН

Косман Е., профессор, Израиль

Каракотов С.Д., дхн, академик РАН,

ЗАО “Щелково Агрохим”

Кюссон М., PhD, Канада

Лаврищев А.В., дсxn, СПбГАУ

Лаптиева А.Б., дбн, ООО “ИЦЗР”

Лунева Н.Н., кбн, ВИЗР

Лысов А.К., ктн, ВИЗР

Мавроди Д., профессор, США

Надыкта В.Д., дтн, академик РАН, ВНИИБЗР

Намятова А.А., кбн, ЗИН

Новикова И.И., дбн, ВИЗР

Павлюшин В.А., дбн, академик РАН, ВИЗР

Радченко Е.Е., дбн, ВИР

Савченко И.В., дбн, академик РАН, ВИЛАР

Санин С.С., дбн, академик РАН, ВНИИФ

Сидельников Н.И., дсxn, академик РАН, ВИЛАР

Синев С.Ю., дбн, ЗИН

Соколова Ю.Я., дбн, США

Сорока С.В., ксxn, Белоруссия

Сухорученко Г.И., дсxn, ВИЗР

Ули-Маттила Т., профессор, Финляндия

Токарев Ю.С., дбн, ВИЗР

Упадышев М.Т., дбн, член-корреспондент РАН, ВСТИСП

Фролов А.Н., дбн, ВИЗР

Хлесткина Е.К., дбн, ВИР

Шамшев И.В., кбн, ЗИН

Шпанев А.М., дбн, АФИ

Ответственные редакторы выпуска:

А.Н. Игнатов, Ю.Я. Соколова, Ю.С. Токарев

Россия, 196608, Санкт-Петербург – Пушкин, шоссе Подбельского, 3, ВИЗР

Email: vestnik@vizr.spb.ru

<http://plantprotect.ru>



Содержимое данного выпуска распространяется на условиях Creative Commons Attribution License 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

СОДЕРЖАНИЕ / CONTENT

| | |
|--|----|
| Предисловие к 105 тому | 4 |
| Preface to the Volume 105 | 5 |
| <i>Полнотекстовые обзоры / Full-text reviews</i> | |
| Перспективы применения аптамеров в защите растений и растениеводстве | |
| А.А. Коваленко, В.В. Шаройко, И.А. Казарцев | |
| Prospects for the application of aptamers in plant protection and crop production | |
| A.A. Kovalenko, V.V. Sharoiko, I.A. Kazartsev. | 6 |
| <i>Мини-обзоры / Mini-reviews</i> | |
| Метод РНК-интерференции в защите растений от насекомых-вредителей | |
| В.С. Журавлев, В.В. Долгих, С.А. Тимофеев, Ф.Б. Ганнибал | |
| RNA interference method in plant protection against insect pests | |
| V.S. Zhuravlev, V.V. Dolgikh, S.A. Timofeev, F.B. Gannibal | 28 |
| <i>Полнотекстовые статьи / Full-text articles</i> | |
| Эффективность инсектицидов против вредителей в рассадной технологии возделывания | |
| капусты белокочанной | |
| П.А. Опякин, Г.П. Иванова | |
| Effectiveness of insecticides against pests of white cabbage grown using seedling technology | |
| P.A. Opyakin, G.P. Ivanova | 40 |
| Molecular detection of endosymbionts in local populations of <i>Helicoverpa armigera</i> | |
| (Lepidoptera: Noctuidae) in European part of Russia | |
| A.G. Kononchuk, S.M. Malysh, A.S. Rumiantseva, D.S. Kireeva, A.V. Gerus, V.S. Zhuravlyov | |
| Молекулярная диагностика эндосимбионтов в популяциях хлопковой совки <i>Helicoverpa armigera</i> | |
| (Lepidoptera: Noctuidae) в Европейской части России | |
| А.Г. Конончук*, С.М. Малыш, А.С. Румянцева, Д.С. Киреева, А.В. Герус, В.С. Журавлёв | 50 |
| Персональные идентификаторы автора научных работ | |
| Personal identifiers of scientific papers' authors | 62 |

ПРЕДИСЛОВИЕ К 105 ТОМУ

Уважаемые читатели, вашему вниманию представляется первый выпуск 105 тома журнала «Вестник защиты растений». Журнал продолжает публиковать обзоры и экспериментальные работы по разнообразным направлениям исследований, методам и объектам, относящимся к проблематике защиты растений от вредных организмов. Два обзора посвящено новым направлениям молекулярной защиты растений, интенсивно развивающимся во всем мире. В частности, Коваленко и др. описали современное состояние исследований и перспективы использования аптамеров в растениеводстве. Под аптамерами понимается часть макромолекулы (нуклеиновой кислоты или полипептида), которая агрегируется с мишенью (небольшие неорганические и органические, а также белковые молекулы) аналогично связыванию антиген-антитела, что позволяет создавать биологические агенты направленного действия, биоаналитические сенсоры и т.п. Безусловно, как подчеркивают авторы статьи, аптамеры открывают новые возможности в использовании молекулярно-генетических подходов в защите растений. Однако остаются малоизученными вопросы эффективности их применения в производственных условиях, биодоступности, биостабильности и биобезопасности для человека и нецелевых объектов, а также стоимости производства коммерческих продуктов.

Не менее интересна рукопись Журавлева и др., в которой дается обзор использования РНК-интерференции для борьбы с вредными насекомыми. Данный подход основан на механизме взаимодействия малых РНК с матричной РНК целевого гена, вызывающего подавление его активности, что требует доставки нуклеиновых кислот к месту экспрессии через кишечник или покровы насекомого. Одна из основных особенностей механизма РНК-интерференции заключается в высокой специфичности действия, так как взаимодействие малых РНК с мишенью определяется принципом комплементарности. Это можно рассматривать как преимущество данного подхода, обеспечивающее воздействие только на целевой объект и ни на что другое, но одновременно это служит и основным недостатком в условиях, когда необходимо проведение защитных мероприятий против комплекса вредителей – ведь в этом случае необходимо применение отдельного РНК-препарата против каждого вида. Аналогично, использование в качестве основы препаратов молекул, обладающих низким уровнем стабильности, служит одновременно их достоинством (быстрая деградация не оставляет возможности для персистирования в экосистемах) и недостатком (требуются специальные разработки, направленные на сохранение действующего препарата на этапах производства и применения). Для индустриального применения РНК-препаратов необходимы дальнейшие исследования в области совершенствования нетрансгенных способов доставки либо разработка систем трансгеноза, что в настоящих условиях возможно далеко не во всех странах. В любом случае, ещё предстоит решить вопросы

возможных побочных эффектов и воздействия нецелевые объекты, стоимости конечной формы РНК-препарата, затрат на биотехнологическое производство и применение.

Однозначно, наш журнал ждет продолжения обозначенных исследований для перехода от лабораторных моделей к конечной биотехнологической реализации.

Тематика молекулярно-биологических исследований продолжена в работе Конончук и др. по изучению распространенности эндосимбионтов в популяциях хлопковой совки, где ПЦР-амплификация и секвенирование специфичных локусов ДНК служит высокопроизводительным и прецизионным, а иногда единственно доступным способом диагностики. В исследовании Опякина и Ивановой показано сохранение эффективности известных инсектицидов для подавления крестоцветных блошек, капустной моли и весенней капустной мухи, а также предложено новое средство для совершенствования ассортимента синтетических пестицидов, что расширяет возможности их ротации в антирезистентных программах защиты растений.

Уважаемые читатели! Кредо нашего журнала определяется основной деятельностью ведущих отечественных научно-исследовательских организаций (ВИЗР, ВНИИБЗР, ВНИИФ и др.), будучи направлено на публикацию материалов, в которых научное обеспечение производственной защиты растений базируется на достижениях научно-технического прогресса в фитосанитарии, а именно, в создании новых систем защиты сельскохозяйственных культур в интенсивном растениеводстве, органическом земледелии и защищенном грунте. В настоящее время в условиях дефицита финансирования и нехватки кадров возникает необходимость в прорывных подходах защиты растений, где новые фундаментальные знания для создания новых фитосанитарных технологий. Например, в Государственном каталоге средств защиты растений в сравнении с химическими пестицидами (1560) очень мало средств биологической защиты сельскохозяйственных культур (60), в то время как природные ресурсы энтомофагов, энтомопатогенов и микробов-антагонистов далеко не исчерпаны. Доля генетически устойчивых сортов в производственных посевах составляет лишь 15-20 %, тогда как для фитосанитарной стабилизации требуется не менее 70-80 %.

Налицо повышение требований к фитосанитарному мониторингу и прогнозу, а именно: широкое применение молекулярно-генетической диагностики вредителей и возбудителей болезней растений; срочное обнаружение и уничтожение первичных очагов особо опасных инфекций на посевах; дистанционное зондирование с.-х. угодий, объединенное с наземным мониторингом сорных растений, болезней и вредителей.

Очевидно, на страницах нашего журнала целесообразно развернуть обсуждение приоритетных направлений фитосанитарии и тем самым обозначить важнейшие элементы в научном обеспечении защиты растений в стране.

Редколлегия.

PREFACE TO THE VOLUME 105

Dear readers, hereby we present the first issue of Volume 105 of *Plant Protection News*. The journal continues to publish reviews and original research papers on various aspects of plant protection from harmful organisms. Two reviews are dedicated to novel directions in molecular plant protection, which is actively developing all over the world. In the first review, Kovalenko et al. described current state and future prospects for the use of aptamers in crop protection. Aptamer is defined as a part of a macromolecule (nucleic acid or polypeptide) that aggregates with a target (small inorganic and organic, as well as protein molecules) in a way similar to the antigen-antibody binding. This enables developing targeted biological agents, bioanalytical sensors, etc. Undoubtedly, as the authors of the article emphasize, aptamers extend horizons of molecular genetic approaches in plant protection. However, the issues of their effectiveness under conditions of industrial farming, of their bioavailability, biostability and biosafety for non-target organisms including humans, as well as production costs of future commercial formulations remain poorly understood.

The second review by Zhuravlev et al. is of no lesser interest, as it provides an overview of the use of RNA interference for management of insect pests. This approach is based on the mechanism of interaction of small RNAs with messenger RNA of the target gene, causing suppression of its activity. It requires the nucleic acid delivery to the expression site through intestines or integuments of a target insect. One of the main features of the RNA interference mechanism is high specificity of its action, since the interaction of small RNAs with the target is determined by the principle of complementarity. This can be considered to be an advantage of this approach, providing activity only against the target species. On the other hand, this feature may also be considered to be a disadvantage when it is necessary to carry out protective measures against a complex of pests. In such a case, it is necessary to use a separate RNA formulation against every pest species of that complex. Similarly, the use of molecules with a low level of stability as the basis for pesticide formulations is both an advantage (rapid degradation does not allow persistence in ecosystems) and a disadvantage (special measures are required to preserve the active ingredient at the production and application stages). For the industrial use of RNA formulations, further research is needed for improving non-transgenic methods of delivery or the development of transgenic systems, which may not be allowed in all countries. In any case, questions regarding possible side effects and action on non-target organisms, the cost of the final form of the RNA formulation, the expenses of biotechnological production and application have yet to be resolved.

Our journal is eagerly awaiting continuation of the aforementioned research efforts to provide transition from laboratory models to the final products used by commercial farmers under field conditions.

The topic of molecular biological research is continued in the work of Kononchuk et al. who examined the prevalence of endosymbionts in populations of the cotton bollworm. PCR amplification and sequencing of specific DNA loci is a highly productive and precise diagnostic method, and sometimes it is the only one available. The study by Opyakin and Ivanova shows continuous effectiveness of known insecticides for suppression of cruciferous flea beetles, cabbage moth, and spring cabbage fly. A new compound is proposed to expand the range of synthetic insecticides against these pests, thus providing additional options for their rotation in resistance management programs.

Our journal aims at publishing materials that provide scientific support for industrial plant protection based on the latest scientific and technological developments in intensive crop production, greenhouse agriculture, and organic farming. Leading scientific organizations of Russia, such as All-Russian Institute of Plant Protection, All-Russian Institute of Biological Plant Protection, All-Russian Institute of Phytopathology etc., determine the mainstream of research in this direction. At present, in the context of insufficient funding a shortage of personnel, there is a demand for breakthrough approaches to plant protection that rely on novel fundamental knowledge to design new phytosanitary technology. In particular, the State Catalog of Plant Protection Agents contains only a very small number of biocontrol agents (60), as compared to synthetic pesticides (1560). This is far from sufficient. Potential new biocontrol agents are far from exhausted among entomophagous arthropods, as well as among entomopathogenic and antagonistic microbes. Moreover, the current share of genetically resistant varieties among industrial crops is only 15-20 %, while at least 70-80 % are needed for creating a stable phytosanitary environment.

In addition, there is an increase in requirements for phytosanitary monitoring and forecasting, namely: widespread use of molecular genetic diagnostics of plant pests and pathogens; rapid detection and elimination of primary foci of dangerous infections within crop stands; monitoring agricultural lands using remote sensing combined with scouting for weeds, diseases and pests on the ground.

We intent starting the discussion on the priority areas of plant health on the Journal's pages in order to identify the most important elements in the scientific support of plant protection in the country.

Editorial board.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ АПТАМЕРОВ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ И РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

А.А. Коваленко^{1,2}, В.В. Шаройко³, И.А. Казарцев^{1*}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

²Научно-образовательный центр инфохимии, Университет ИТМО, Санкт-Петербург,

³Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

* ответственный за переписку, e-mail: kazartsev@inbox.ru

В современном сельском хозяйстве существует запрос на поиск альтернативных способов повышения урожайности, на усовершенствование методов детектирования химических загрязнений, улучшение качества фитосанитарной диагностики и эффективности средств защиты растений. Интересные решения в данных областях могут быть получены с использованием технологии аптамеров. Аптамеры – олигонуклеотидные и пептидные молекулы, способные к молекулярному распознаванию как небольших неорганических и органических молекул, так и белков. Получение аптамеров, специфичных в отношении целевой мишени, осуществляется *in vitro* с использованием технологии SELEX. Связывание аптамеров с мишенью происходит по принципу взаимодействия пары антиген-антитело. Благодаря этому свойству аптамеры нашли применение в разработке биологических агентов направленного действия, «умных» материалов и биоаналитических сенсоров нового поколения. Настоящий обзор представляет собой краткий анализ успехов и перспектив применения технологии аптамеров для решения задач аналитического мониторинга и фитосанитарного контроля. В частности, рассмотрены некоторые подходы к созданию тест-систем и сенсоров на основе аптамеров для определения разных групп веществ в природных объектах, а также перечислены созданные коммерческие продукты. Приведены примеры использования аптамеров в качестве «умных» удобрений, инновационных пестицидов и для создания растений, устойчивых к вирусным заболеваниям.

Ключевые слова: аптамеры, олигонуклеотиды, пептиды, защита растений, биосенсоры, нанодобрения, пестициды

Поступила в редакцию: 24.12.2021

Принята к печати: 28.02.2022

Введение

В настоящее время стало очевидно, что традиционные сельскохозяйственные технологии способны нанести существенный вред окружающей среде или попросту не приносят ожидаемого результата. Так, например, отмечается низкая эффективность усвоения минеральных удобрений растениями, и сопутствующее загрязнение окружающей среды (Aziz et al., 2019). Активное и повсеместное внесение пестицидов также оказывает многостороннее негативное влияние на здоровье человека и состояние экосистем. К тому же в популяциях вредных видов на различных сельскохозяйственных культурах наблюдается глобальное развитие резистентности к применяемым пестицидам (Whalon et al., 2008 ; Rani et al., 2021). В связи с этим существует запрос на обновление технологий в сфере производства и применения удобрений и пестицидов. Загрязнение окружающей среды ксенобиотиками, природными токсинами, патогенными микроорганизмами и т.д. обуславливает необходимость в широкомасштабном и экономически эффективном мониторинге качества сельскохозяйственной продукции и экологического состояния природных объектов (FAO, 2020). Потребность в решении этих задач служит движущей силой для развития биотехнологий и инноваций в сельском хозяйстве. В частности, большие надежды в этих областях возлагаются на использование технологии аптамеров (Yadav et al., 2019).

Термин аптамеры (от лат. «artus», подходящий, и «meros», часть) объединяет две группы искусственных (синтетических) молекул (олигонуклеотиды и пептиды),

важное свойство которых – способность к прочному и специфичному связыванию молекул-мишеней. Отметим, что термин «аптамер» чаще относится именно к молекулам олигонуклеотидов. Аптамеры на основе нуклеиновых кислот (НК-аптамеры) – это одноцепочечные молекулы ДНК и РНК длиной несколько десятков оснований (редко более 100 оснований). НК-аптамеры часто называют олигонуклеотидными аналогами антител. Название этому классу молекул было дано в 1990 г. Ellington и Szostak в работе, описывающей получение коротких РНК, способных специфично связываться с некоторыми органическими красителями (Ellington, Szostak, 1990). В дальнейшем была многократно продемонстрирована возможность *in vitro* отбора олигонуклеотидов, специфичных к веществам разнообразной природы. При этом в качестве мишени могут служить соединения разной природы (Dunn, 2014).

Принцип связывания НК-аптамеров с мишенью подобен взаимодействию пары антиген-антитело, фермент-субстрат или гормон-рецептор – это обратимое конформационно-зависимое нековалентное многоточечное взаимодействие по типу «рука-перчатка» (Patel, Suri, 2000; Dunn, 2014) (рис. 1). Связывание аптамера с целевой молекулой происходит за счет стерического соответствия мишени сайту связывания, которое сопровождается образованием множественных нековалентных взаимодействий различной химической природы. Мерой аффинности (прочности) связывания аптамера с мишенью выступает константа диссоциации комплекса аптамер-мишень (K_d),

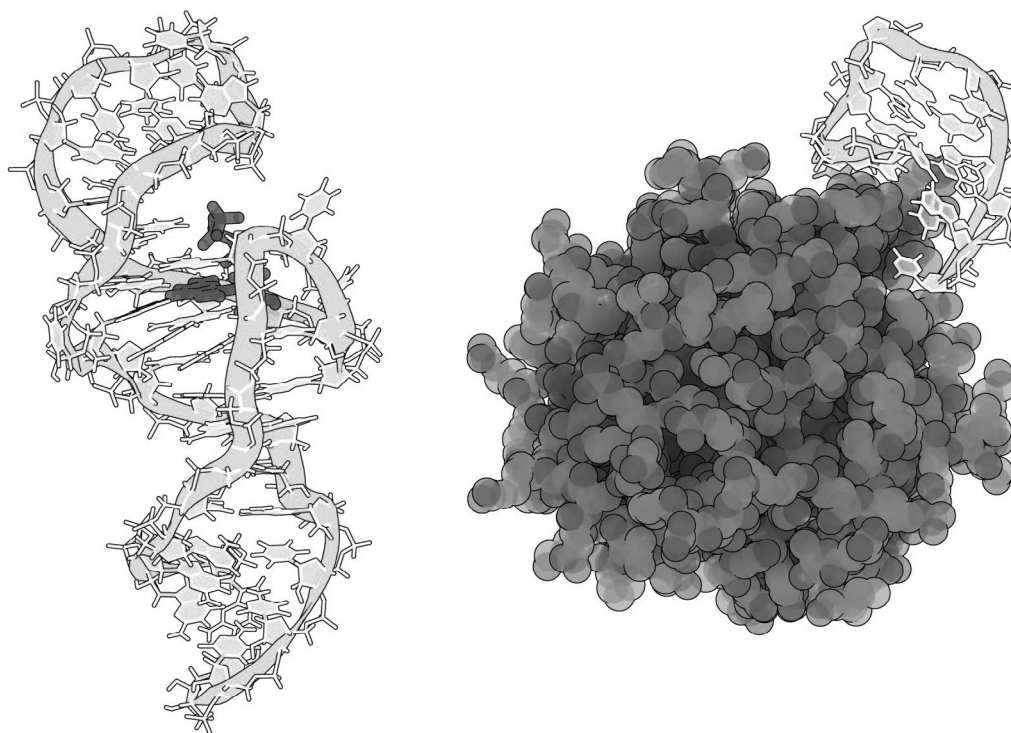


Рисунок 1. Слева связывание РНК-аптамера (фиолетовый – светлый) с ГТФ (оранжевый – темный) PDB 2AU4. Справа связывание человеческого альфа-тромбина (оранжевый – темный) с ДНК-аптамером (фиолетовый – светлый) PDB 4DIH. Визуализировано в Protein Imager [ориг.]. **Цветной вариант рисунка размещен на обложке**

Figure 1. Left: binding of RNA aptamer (purple – light) to GTP (orange – dark) PDB 2AU4. Right: binding of human alpha thrombin (orange – dark) to DNA aptamer (purple – light) PDB 4DIH. Visualized with Protein Imager [orig.]

See color version on the front page of the cover

значение которой обычно варьирует в пределах 10^{-11} – 10^{-7} M (Dunn, 2014). Аналогичный диапазон K_d характерен и для антител. Природа специфичности аптамеров также кроется в их трехмерной структуре, обеспечивающей уникальное расположение функциональных групп олигонуклеотида, взаимодействующих с мишенью. Даже небольшие изменения в структуре мишени могут повлиять на аффинность связывания. В качестве примера можно привести аптамер к теofilлину, который обладает в 10 000 раз более высоким сродством к нему, чем к кофеину, при разнице структур в 1 метильную группу (Jenison et al., 1994). Аптамеры чувствительны и к оптической изомерии. Так, РНК-аптамер к L-аргинуину обладает в 12000 раз более высокой аффинностью к L-изомеру, чем к D-изомеру (Geiger et al., 1996). За более подробным описанием взаимодействия аптамеров с мишенями можно обратиться к обзорам Patel и Suri (2000), а также Dunn (2014).

Отбор аптамеров к целевой молекуле проводят *in vitro* с использованием технологии SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения). В процессе отбора исходная библиотека рандомизированных олигонуклеотидов обогащается последовательностями (аптамерами), специфичными к целевой мишени. Процедура состоит из последовательных раундов. В каждом раунде: (i) проводится инкубация библиотеки олигонуклеотидов с мишенью и отделение связавшихся с ней последовательностей; (ii) последовательности, аффинные к мишени, амплифицируются при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР); (iii) из ПЦР продуктов выделяют

одноцепочечные олигонуклеотиды (обогащенную аптамерами библиотеку), которые вводят в следующий раунд отбора (рис. 2). После серии раундов полученные аптамеры секвенируют, отбирают последовательности потенциально аффинных аптамеров, затем их синтезируют и изучают индивидуальное связывание с мишенью (Komarova, Kuznetsov, 2019).

В литературе описано множество вариантов SELEX, различающихся по методам фракционирования библиотеки, мониторинга аффинности аптамеров и т.д. Возможные модификации метода позволяют работать с мишенями разнообразной природы: неорганические ионы, малые органические молекулы, пептиды и белки, полисахариды, вирусные частицы, клетки и одноклеточные организмы, даже целые ткани (Darmostuk et al., 2014). Технология SELEX продолжает развиваться в сторону более простых, быстрых и автоматизированных процедур отбора. Накопление экспериментального опыта, применение технологий NGS (next generation sequencing, секвенирование нового поколения) и математического моделирования позволяет все лучше понимать процесс SELEX и приближает отбор аптамеров к рутинному биотехнологическому методу. Актуальные достижения, тенденции и принципы SELEX рассмотрены в ряде обзоров (Darmostuk et al., 2014; Komarova, Kuznetsov, 2019). SELEX объединяет много разных подходов, поэтому научные коллективы, желающие адаптировать эту технологию для своей работы, могут выбрать методику, наилучшим образом отвечающую поставленным целям и сопоставимую с их техническими возможностями. Работа с НК-аптамерами может

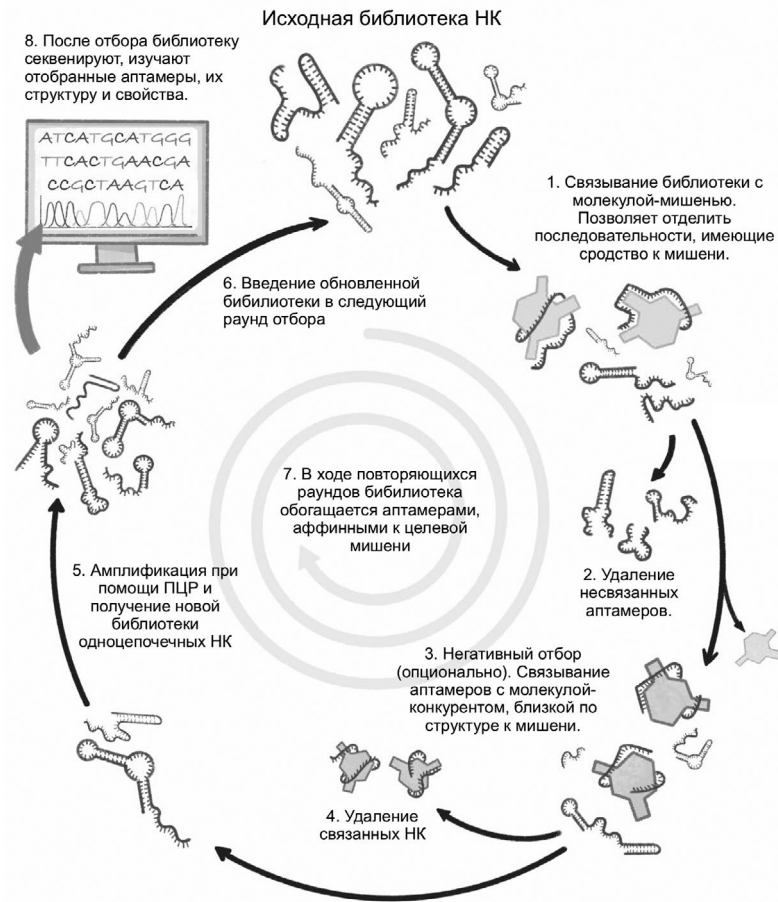


Рисунок 2. Каноническая схема этапов SELEX [ориг.]

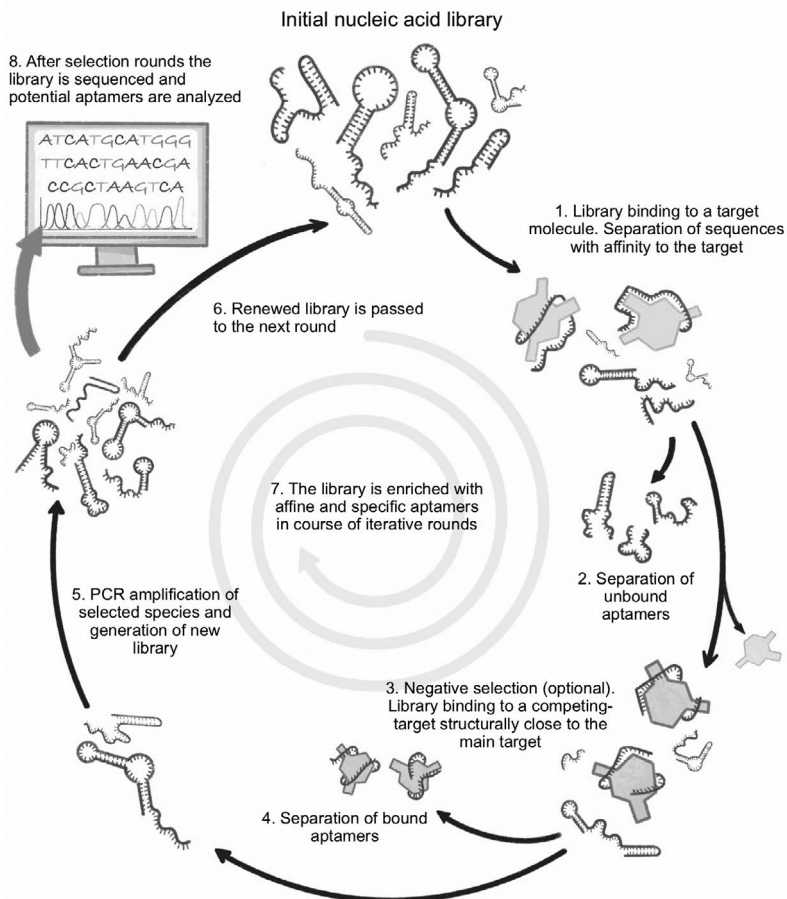


Figure 2. Canonical scheme of SELEX stages [orig.]

обходиться и без SELEX. Исследователи могут использовать опубликованные аптамеры для своих проектов, заказав их в компаниях, занимающихся автоматизированным синтезом олигонуклеотидных последовательностей. База данных Apta-Index™, содержащая более 700 аптамеров, представлена на онлайн-портале компании «Aptagen» (Apta-Index™, 2019). К сожалению, эта необновляемая база на сегодняшний день является единственной доступной. При необходимости найти аптамер к интересующей молекуле стоит обратиться к научной литературе.

Аптамеры зарекомендовали себя в качестве серьезного конкурента технологии антител. В сравнении с ними аптамеры имеют ряд преимуществ, а именно: (i) производятся относительно дешевым автоматизированным химическим синтезом; (ii) проявляют минимальную иммуногенность; (iii) обладают большей термической стабильностью и способностью к ренатурации с сохранением свойств; (iv) поддаются гибкой химической модификации и т.д. При этом аптамеры ничуть не уступают антителам в отношении аффинности и специфичности связывания с целевой молекулой (Dunn, 2014). Большое число работ посвящено аптамерам как терапевтическим агентам. Описано создание систем доставки лекарств, средств диагностики, био-визуализации и тераностики на основе аптамеров (Huang et al., 2015). Аптамеры привлекаются в качестве распознающих элементов для дизайна высокочувствительных и специфичных сенсоров (аптасенсоров), позволяющих детектировать целевой аналит в многокомпонентных образцах. Растет количество публикаций, описывающих разнообразные аптасенсоры для определения как низкомолекулярных соединений, так и крупных биомолекул, клеток и микроорганизмов (Huang et al., 2015). Не смотря на преимущественный интерес к технологии аптамеров в сфере медицинских разработок, растет и число работ, актуальных для решения задач в агропромышленном секторе.

Существенный недостаток НК-аптамеров, ограничивающий их эффективность в биологических средах – это стремительная деградация в присутствии нуклеаз. К тому же при эксплуатации аптамеров в условиях, отличных от условий отбора *in vitro*, можно столкнуться со снижением их аффинности. Исследователи решают эти проблемы посредством химической модификации нуклеотидов, конъюгации со стабилизирующими молекулами и т.д. (Dunn, 2014). Гибкость химической модификации позволяет использовать аптамеры для решения разнообразных задач, к примеру, для введения флуоресцентных меток,

иммобилизации на полимерных носителях или поверхности электродов в дизайне гибридных материалов (Dunn, 2014). Обзор подходов к модификации аптамеров представлен в работе Odeh с соавт. (2020).

Аптамерами также называют отдельный класс белковых молекул. Белковые аптамеры, пептимеры, представляют собой короткие переменные участки последовательно соединенных аминокислот, как правило, встроенных в белковую матрицу (носитель). Эти участки обеспечивают аффинность к определенной молекулярной мишени. Отбор пептимеров проводят из рандомизированных библиотек как *in vitro*, так и *in vivo*. Наиболее часто задействуют *in vivo* дрожжевую двухгибридную систему, которая позволяет отбирать пептимеры, активные в физиологических условиях. К *in vitro* технологиям отбора относятся фаговый дисплей и мРНК дисплей. Несмотря на подобие пептимеров антителам, от последних они отличаются малым размером, синтетической (искусственной) природой и подходами к разработке. Среди преимуществ пептимеров в сравнении с антителами: высокая стабильность и растворимость, высокий выход при бактериальной экспрессии, возможность химического синтеза, быстрый фолдинг и в некоторых случаях отсутствие дисульфидных связей и свободных остатков цистеина. Более того, пептидные аптамеры имеют K_d сравнимые, а иногда и ниже, чем таковые для антител. Тем не менее процесс получения пептимеров заметно сложнее, чем НК-аптамеров, что объясняет относительно большую популярность последних.

Селективное и прочное связывание аптамеров с мишенью позволяет использовать их как инструмент для инновационных биоаналитических решений, «умных» материалов (материалов, меняющих свои свойства под действием внешних факторов) и биологически активных агентов нового поколения. Настоящий обзор посвящен перспективам применения аптамеров для решения задач, возникающих в агропромышленном комплексе и пищевой безопасности, и обобщает достижения в этой области. Стоит отметить, что подавляющее большинство опубликованных работ посвящено именно биоаналитическому применению аптамеров. Существенно меньшее количество работ исследует аптамеры в качестве пестицидов, компонентов систем контролируемого высвобождения удобрений или для решения иных задач. Ниже приведена систематизация существующих направлений и подходов, иллюстрирующая многофункциональность аптамеров как инструмента для биотехнологических разработок.

Биоаналитические решения на основе аптамеров

Всесторонний мониторинг качества в пищевой и кормовой индустрии – важное направление аналитической и биоаналитической химии. Круг задач в этой области широк: от обнаружения патогенных микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности (белков, низкомолекулярных метаболитов) до контроля качества продукции или мониторинга антропогенных загрязнений (переходных металлов, пестицидов, удобрений, промышленных отходов и т.д.) (Romero-González, 2015). Отчет Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (FAO) от 2020 г. выделяет следующие актуальные проблемы пищевой безопасности: пищевые патогены и паразиты, цветение воды,

тяжелые металлы, пестициды, микотоксины и др. (FAO, 2020).

К традиционным методам химического анализа пищевых продуктов и природных объектов относятся: масс-спектрометрия (МС), ядерный магнитный резонанс (ЯМР), спектрофотометрия, инфракрасная спектроскопия (ИКС) и УФ-спектроскопия, атомная спектроскопия (АС), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газовая хроматография (ГХ), капиллярный электрофорез (КЭ), электрохимический анализ и т.д. Перечисленные методы имеют широкие возможности, но иногда требуют дорогостоящего оборудования, значительных временных затрат, привлечения квалифицированного персонала для

проведения анализа и интерпретации результатов. При работе с биологическими объектами важную роль играют молекулярно-биологические подходы, такие как ПЦР, биохимические и иммунохимические методы. Указанные методы не универсальны и зачастую имеют значительные ограничения (Romero-González, 2015; Rodríguez et al., 2021). В связи с этим ведется поиск новых многопрофильных, экспрессных, портативных и эргономичных сенсорных устройств для анализа сельскохозяйственной продукции и природных объектов.

На развитие экспресс-анализа в свое время повлияло появление технологии антител. Иммунохимические методы позволили разработать наборы для быстрого и простого определения многих веществ: от низкомолекулярных антибиотиков, пестицидов, природных токсинов до патогенных микроорганизмов. При этом технология антител имеет ряд ограничений, связанных с дорогостоящей разработкой и производством белков, специальными условиями хранения, ограниченными возможностями химической модификации и т.д. (Xiao et al., 2021).

Новые решения, альтернативные существующим иммунохимическим методам, могут быть созданы на основе аптамеров, подобрать которые можно практически к любой молекулярной мишени. Это позволяет использовать аптасенсоры для решения широкого круга аналитических задач. Другой подход состоит в дизайне аффинных сорбентов, позволяющих селективно выделять и концентрировать целевой аналит для дальнейшего определения. Подробный обзор аффинных аптасорбентов представлен в работе Pichon с соавт. (2015).

Описан широкий спектр оригинальных подходов по созданию аптасенсоров, но подавляющее большинство из них относится к оптическим или электрохимическим сенсорам. Оптические сенсоры, основаны на принципе детекции аналитического сигнала флуориметрическими и колориметрическими методами и реже – хемилуминометрическими или при помощи спектроскопии комбинационного рассеяния. Как правило, в перечисленных подходах аптамер сочетается с оптически активным маркером. Связывание мишени индуцирует конформационное изменение в молекуле аптамера, которое может выражаться в высвобождении красителя, тушении или возникновении флуоресценции, а также иных процессах, детектируемых оптическими приборами. Некоторые варианты оптических сенсоров весьма просты и могут быть воспроизведены во многих лабораториях, располагающих оптическим измерительным прибором. Помимо этого, существуют подходы для визуального определения аналита, к примеру: тест-полоски, индикаторные полоски (Pliuk et al., 2011; Evtugyn, Nianik, 2019; Goud et al., 2020).

В электрохимических сенсорах аптамеры иммобилизуют на поверхности электрода, а регистрация сигнала при связывании аналита производится в режимах потенциометрии, спектроскопии электрохимического импеданса (СЭИ), дифференциальной импульсной вольтамперометрии, циклической вольтамперометрии (ЦВА), квадратно-волновой вольтамперометрии и т. д. Электрохимические сенсоры обладают хорошим потенциалом миниатюризации и стандартизации, что позволяет проводить разработку доступных коммерческих тестов по типу глюкометра (Pliuk et al., 2011; Evtugyn, Nianik, 2019; Goud

et al., 2020). Тем не менее, возможности их лабораторного применения доступны менее широкому кругу научных коллективов в силу необходимости специального оборудования и соответствующих навыков.

Наиболее широкое биоаналитическое применение находят именно НК-аптамеры, в связи с чем ниже будут рассмотрены сенсоры только на их основе. В обзоре приведены примеры дизайна оптических и электрохимических сенсоров, показывающие возможность работы с широким кругом аналитов и разными вариантами их выявления. Схема детекции, рассмотренная на примере конкретного соединения, часто может быть адаптирована и для другого аналита путем замены аптамера и оптимизации условий анализа. Отметим также, что характеристики методик (предел обнаружения и линейный диапазон) приведены в единицах и с точностью, указанными авторами оригинальных работ. Так как цитируемые работы преимущественно описывают результаты применения разработок в лабораторных условиях, то их поточное широкомасштабное внедрение составляет отдельную задачу, которую еще предстоит решить.

Более подробный разбор аптасенсоров и принципов их действия можно найти в ряде обзорных работ (Tombelli et al., 2007; Pliuk et al., 2011). Работа Zhang с соавт. (2020) фокусируется на мультиплексных аптасенсорах для анализа пищевой продукции. Обзор Shan с соавт. (2020) рассматривает применение электрохимических аптасенсоров на основе нанокомпозитов для детектирования токсинов грибов, водорослей и бактериальных энтеротоксинов. Отдельные обзоры также посвящены оптическим сенсорам (Lan et al., 2017) и методам гомогенного анализа пищевой продукции (Xia et al., 2020a).

Аптамеры к микотоксинам

Микотоксины – это низкомолекулярные биологически активные метаболиты филаментных фитопатогенных грибов. В настоящее время идентифицировано около 300–400 микотоксинов, но лишь некоторые из них представляют опасность для здоровья человека и животных. Некоторые наиболее изученные с точки зрения токсикологии вещества: охратоксин А (ОТА), афлатоксины В1 и М1 (АФВ1, АФМ1), зеараленон (ЗЕН), патулин, фумонизины В1 и М1 (ФВ1, ФМ1), а также трихотеценовые микотоксины (Т-2 и НТ-2 токсины, ниваленол и дезоксиниваленол). Среди микотоксинов обнаруживаются мутагенные, канцерогенные, тератогенные, геморрагические, гормональные, гено-, гепато-, иммуно-, дермо-, нефро- и нейротоксические соединения (Bennett, Klich., 2003).

Основные подходы для анализа этих веществ основаны на высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии (МС). Для многих токсинов доступны наборы для иммуноферментного анализа (ИФА) (Tittlemier et al., 2021). Широкое распространение загрязнения микотоксинами пищевой и кормовой продукции делает необходимым развитие подходов для масштабного и экспрессного мониторинга. В силу большой значимости этой группы веществ в пищевой безопасности они оказались в фокусе множества работ по разработке инновационных биосенсоров. В связи с этим применение аптамеров к микотоксинам заслуживает отдельного рассмотрения. На сегодняшний день описано довольно много

аптамеров к микотоксинам, некоторые примеры представлены в таблице 1. Одной из первых разработками таких аптамеров занялась компания «NeoVentures Biotechnology Inc.» (Канада), которая еще в 2008 г. предложила аптамер, специфичный к ОТА. В 2011 г. компанией запатентована методика определения микотоксинов с помощью аптамеров на примере все того же аптамера к ОТА (Allen, Andres, 2010). Кроме того, можно отметить деятельность коллектива «Key Laboratory of Food Science and Technology» (Университет Цзяннань, Китай). При участии специалистов этой лаборатории были разработаны аптамеры к АФВ1 (Ma et al., 2014), ФВ1 и ФМ1 (Chen et al., 2014a), Т-2 токсину (Chen et al., 2014b), ЗЕН (Chen et al., 2013) и патулину (Wu et al., 2016).

Накоплен богатый опыт разработки как оптических, так и электрохимических аптасенсоров для определения микотоксинов в реальных объектах (Evtugyn, Nianik, 2019; Goud et al., 2020). Простейший оптический сенсор основан на флуориметрическом выявлении токсина при помощи немодифицированного аптамера и красителя SYBR Green I (асимметричный краситель класса цианинов), флуоресценция которого проявляется при взаимодействии с нуклеиновыми кислотами. Связывание аптамера с мишенью приводит к вытеснению связанных молекул красителя и понижению сигнала флуоресценции (рис. 3А).

Линейная связь между понижением сигнала флуоресценции и концентрацией микотоксина позволяет задействовать методику для количественного анализа. Подобный подход апробирован для многих веществ, в том числе для ОТА (McKeague et al., 2014). Авторы работы описали измерение концентрации ОТА лишь в градуировочных растворах, установив предел обнаружения (ПО) 9 нМ (3.6 ppb) и линейный диапазон (ЛД) градуировочного графика 9–100 нМ. Чувствительность методики к охратоксину В, гомологу ОТА, в 6–10 раз меньше, чем для целевого токсина. В другом случае, модифицированная версия методики с красителем SYBR Gold позволила количественно определить ОТА в образцах пива и вина (Lv et al., 2017). Отметим, что успешное флуориметрическое определение с SYBR-красителями было уже продемонстрировано и для антибиотиков, в том числе на примере реальных образцов (Yang et al., 2018; Yi et al., 2019).

Наиболее распространенные подходы к созданию оптических сенсоров включают иммобилизацию аптамеров на носителе: полимерной смоле или наночастицах. Например, описана детекция АФВ1 с помощью аптамеров, иммобилизованных на магнитных наночастицах. При связывании аналита происходит высвобождение комплементарной флуоресцентно-меченой пробы, концентрация которой в растворе измеряется после магнитной сепарации

Таблица 1. Аптамеры к наиболее важным микотоксинам

| Микотоксин | Константа диссоциации, K_d | Ссылка |
|------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Охратоксин А (ОТА) | 290 ± 150 нМ и 110 ± 50 нМ | (McKeague et al., 2014) |
| Охратоксин А (ОТА) | 200 нМ | (Cruz-Aguado, Penner, 2008) |
| Афлатоксин В1 (АФВ1) | 11.39 нМ | (Ma et al., 2014) |
| Афлатоксин В1 (АФВ1) | 96–221 нМ (5 аптамеров) | (Malhotra et al., 2014) |
| Афлатоксин М1 (АФМ1) | 35–1515 нМ (36 аптамеров) | (Malhotra et al., 2014) |
| Афлатоксин В2 (АФВ2) | 9.83 нМ | (Ma et al., 2015) |
| Фумонизин В1 (ФВ1) | 100 ± 30 нМ | (McKeague et al., 2010) |
| Фумонизин В1 (ФВ1) | 62±5 нМ | (Chen et al., 2014a) |
| Лизергамид | 44 нМ ² | (Rouah-Martin et al., 2012) |
| Метерголин | 73 нМ и 499 нМ (2 аптамера) | (Rouah-Martin et al., 2012) |
| Патулин (ПАТ) | 21.83±5.022 нМ | (Wu et al., 2016) |
| Т-2 токсин | 20.8 ± 3.1 нМ | (Chen et al., 2014b) |
| Зеараленон (ЗЕН) | 41±5 нМ | (Chen et al., 2013) |
| Дезоксиниваленол (ДОН) | - | (Wu et al., 2012) |

Table 1. Aptamers to most important mycotoxins

| Mycotoxin | Dissociation constant, K_d | Reference |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Ochratoxin A (OTA) | 290 ± 150 nM and 110 ± 50 nM | (McKeague et al., 2014) |
| Ochratoxin A (OTA) | 200 nM | (Cruz-Aguado, Penner, 2008) |
| Aflatoxin B1 (AFB1) | 11.39 nM | (Ma et al., 2014) |
| Aflatoxin B1 (AFB1) | 96–221 nM (5 aptamers) | (Malhotra et al., 2014) |
| Aflatoxin M1 (AFM1) | 35–1515 nM (36 aptamers) | (Malhotra et al., 2014) |
| Aflatoxin B2 (AFB2) | 9.83 nM | (Ma et al., 2015) |
| Fumonisin B1 (FB1) | 100 ± 30 nM | (McKeague et al., 2010) |
| Fumonisin B1 (FB1) | 62±5 nM | (Chen et al., 2014a) |
| Lysergamide | 44 nM ² | (Rouah-Martin et al., 2012) |
| Metergoline | 73 nM and 499 nM (2 aptamers) | (Rouah-Martin et al., 2012) |
| Patulin (PAT) | 21.83±5.022 nM | (Wu et al., 2016) |
| T-2 toxin | 20.8 ± 3.1 nM | (Chen et al., 2014b) |
| Zearalenone (ZEN) | 41±5 nM | (Chen et al., 2013) |
| Deoxynivalenol (DON) | - | (Wu et al., 2012) |

(Ma et al., 2014) (рис. 3В). Для сенсора авторы использовали аптамер к АФВ1 с K_d 11.39 нМ и высокой специфичностью к целевому токсину: аффинность аптамера по отношению к АФВ2 и другим родственным токсинам не превосходила 15% от аффинности к АФВ1. Градуировочный график для сигнала флуоресценции имеет широкий ЛД 50–1.500 нг/л. ПО методики 35 нг/л. Методика была апробирована для определения АФВ1 в образцах арахисового масла с добавками токсина (0–800 нг/л). Во всех вариантах получены достоверные результаты, содержание токсина составляло 94.2–101.2% от расчетного.

Другой распространенный режим детекции в оптических сенсорах – колориметрия. Как правило, колориметрические аптасенсоры используют аналитические реакции, катализируемые ферментами и наночастицами (Majdinasab et al., 2021). К примеру, описано определение ЗЕН в образцах кукурузного масла на основе колориметрической реакции окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, катализируемой частицами золота (Sun et al., 2018). Десорбция аптамеров с частиц при связывании ЗЕН

обеспечивает смену окраски раствора, интенсивность которой пропорциональна концентрации аналита (ЛД 10–250 нг/мл, ПО 10 нг/мл).

Более простой и неоднократно апробированный подход для колориметрического детектирования аналитов основан на агрегации наночастиц Au или Ag в растворах с высокой концентрацией NaCl. Адсорбция аптамеров на частицах стабилизирует их в растворе соли. Связывание аптамеров с токсином приводит к десорбции аптамеров и агрегации частиц со сменой окраски коллоида от красной к синей (для частиц Au), детектируемой фотометрически (Yang et al., 2011; Yin et al., 2017) (рис. 3С). Работа Yin с соавт. (2017) описывает агрегацию наночастиц Au для анализа образцов белого вина с добавками ОТА. ЛД определения ОТА составил 32–1024 нг/мл, а ПО 20 нг/мл. Анализ образца занимает порядка 5 мин. Так, в работе (Kasoji et al., 2020) описан аптасенсор для определения АФВ1, который работает по принципу индикаторной бумажной полоски и позволяет детектировать токсин в градуировочных растворах в диапазоне от 1 пМ до 1 мМ. Недостаток

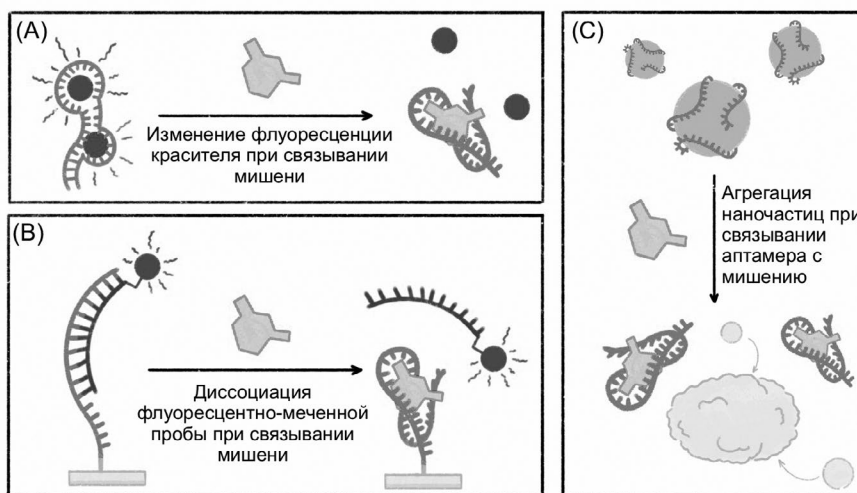


Рисунок 3. Подходы к дизайну оптических аптасенсоров. (А) Связывание аптамера вызывает изменение флуоресценции красителя. (В) Связывание мишени с аптамером вызывает диссоциацию комплементарной флуоресцентно-меченной пробы. (С) Десорбция аптамеров с поверхности наночастиц при связывании мишени вызывает агрегацию, детектируемую фотометрически. [ориг.]

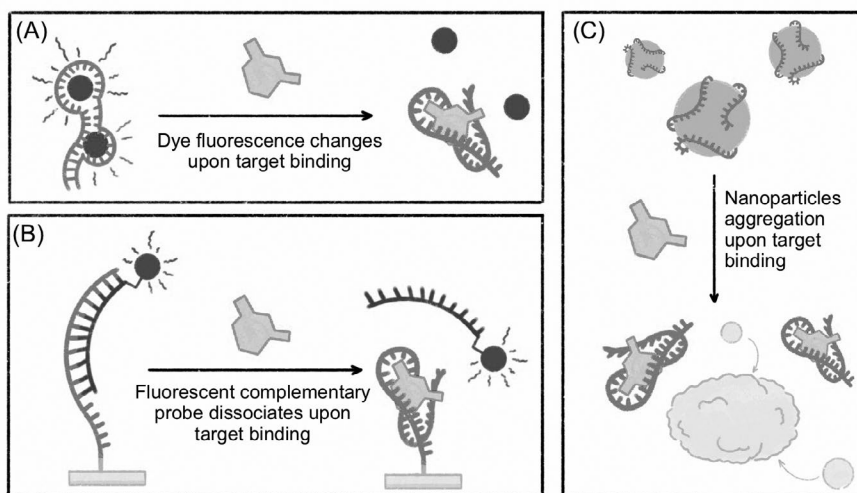


Figure 3. Approaches for the design of optical aptasensors. (A) Aptamer binding induces change in dye binding and fluorescence intensity. (B) Aptamer binding induces dissociation of the complementary fluorescent probe. (C) Desorption of aptamers from the surface of nanoparticles upon target binding leads to aggregation, which is detected photometrically. [orig.]

методик с наночастицами состоит в способности некоторых веществ, в том числе некоторых микотоксинов, адсорбироваться на частицах и препятствовать агрегации, что может привести к заниженным результатам измерений (Majdinasab et al., 2021).

Подходы для создания визуальных тестов не ограничиваются агрегацией наночастиц. Серия работ посвящена разработке тест-полосок по аналогии с иммунохроматографическим анализом для выявления одного или нескольких токсинов одновременно (Majdinasab et al., 2021).

К примеру, предложены тест-полоски для ОТА, позволяющие определять токсин в образцах кукурузы за 20 мин (ЛД 1–1000 нг/мл, ПО 0.40 нг/мл) (Zhang et al., 2018) (рис. 4).

Следует отметить, что разнообразие представленных в цитируемых работах параметров аптасенсоров (ПО и ЛД) делает затруднительным их систематическое сопоставление с установленными предельно допустимыми нормами для отдельных веществ. Однако в целом можно заключить, что описанные оптические аптасенсоры имеют перспективу для дальнейших разработок с точки

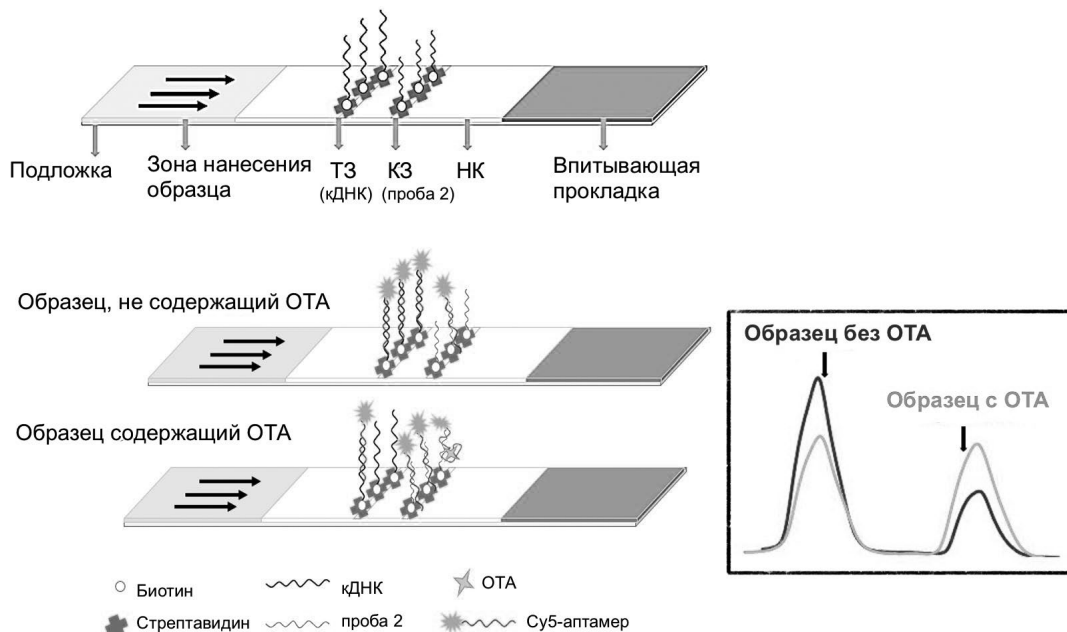


Рисунок 4. Определение охратоксина А (ОТА) при помощи тест-полосок на основе флуоресцентно-меченного Cy5-аптамера. Комплементарные пробы (кДНК и проба 2) иммобилизуются на полоске за счет биотин-стрептавидинового взаимодействия. Полоска содержит тестовую зону (ТЗ), контрольную зону (КЗ) и зону негативного контроля (НК). Нижняя правая часть рисунка иллюстрирует изменение соотношения сигналов флуоресценции ТЗ и КЗ в образцах в присутствии и отсутствие токсина. Иллюстрация из статьи открытого доступа (Zhang et al., 2018)

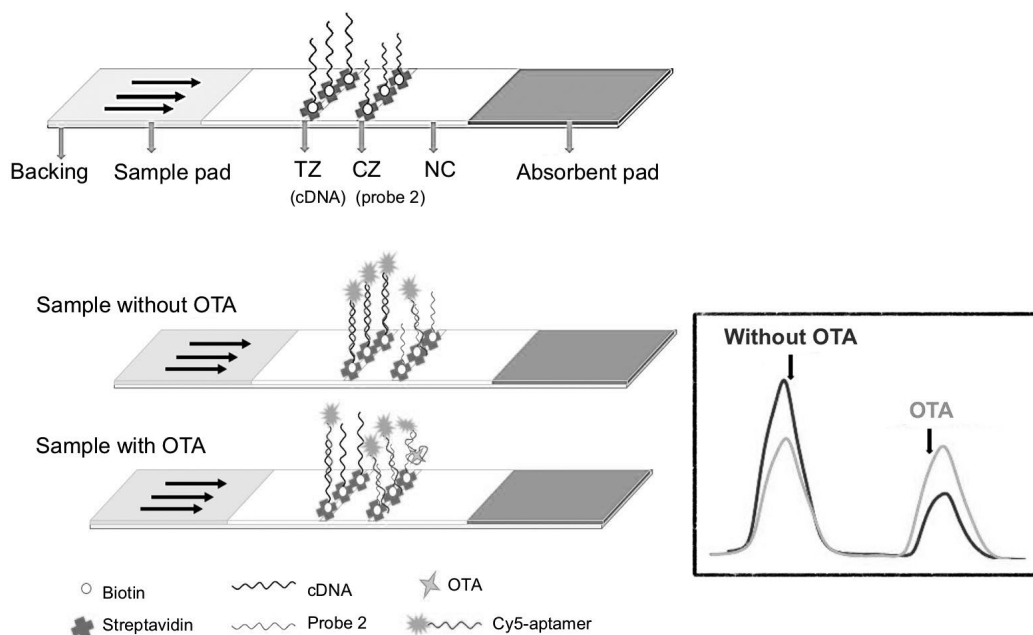


Figure 4. Determination of ochratoxin A (OTA) using lateral-flow strips based on fluorescently labeled Cy5 aptamer. Complementary probes (cDNA and probe 2) are immobilized on the strip via biotin-streptavidin interaction. The strip includes a test zone (TZ), a control zone (CZ) and a negative control zone (NC). The lower right part of the figure illustrates the change in fluorescence signals ratio of TZ and CZ in presence and absence of the toxin. Illustration from an open access article (Zhang et al., 2018)

зрения чувствительности, селективности и экспрессности детектирования. При этом многие подходы могут быть воспроизведены при помощи простых и малозатратных процедур.

Подробный разбор электрохимических аптасенсоров к микотоксинам представлен в работе Evtugyn и Nianik (2019). В работе Goudc с соавт. (2020) также описаны актуальные разработки для регистрации микотоксинов с использованием разнообразных наноматериалов.

Помимо сенсоров, аптамеры могут служить для выделения и концентрирования мишени перед анализом, что значительно упрощает аналитическую процедуру. Описана экстракция ОТА из образцов пшеничной муки на аффинной колонке, модифицированной аптамерами, с последующей элюцией и его флуориметрическим определением (Cruz-Aguado, Penner, 2008). Процедура апробирована для анализа сертифицированных образцов муки с естественным содержанием токсина. Предварительное испытание удерживающей способности колонки с использованием 100 нМ раствора ОТА показало, что колонка удерживает 97% аналита. Аналогичная одностадийная процедура экстракции была продемонстрирована на примере силикагеля, модифицированного аптамерами, для селективной экстракции эргозина, эргокриптоина и эргокорнина из образцов ржи перед ВЭЖХ-МС/МС анализом (Rouah et al., 2014).

Важно отметить, что применение аптамеров не ограничивается задачами выделения и детекции. Аптамеры – многофункциональный инструмент для исследовательской работы. К примеру, описан нанозонд на основе аптамера для визуализации ОТА в клеточной культуре HeLa, инкубированной в присутствии токсина (Xia et al., 2020b). Этот пример иллюстрирует творческий потенциал для применения аптамеров при решении разнообразных задач.

Аптамеры к прочим малым органическим молекулам

К органическим анализам, представляющим интерес для пищевой и кормовой промышленности, относятся не только микотоксины, но и множество других органических веществ. Основными методами для их анализа служат ЯМР, ВЭЖХ, ГХ, МС и т.д., которые, как уже отмечалось, плохо удовлетворяют целям широкомасштабного и экспрессного мониторинга (Romero-González, 2015; Rodriguez et al., 2021).

Пестициды и антибиотики. Химические препараты для борьбы с патогенами животных и растений стали большим прорывом в индустрии XX века, но с годами стали очевидны и сопутствующие проблемы. Антибиотики и пестициды позволили эффективно бороться с вредными организмами, однако их чрезмерное внесение привело не только к появлению резистентных организмов, но и к серьезному загрязнению окружающей среды и сельскохозяйственной продукции (Rani et al., 2021). В связи с этим, аналитический контроль пестицидов и антибиотиков необходим во многих отраслях сельского хозяйства и на разных стадиях производства. В литературе можно найти аптамеры, специфичные ко многим органическим пестицидам и антибиотикам, таким как офлоксацин (Reinemann et al., 2016), атразин (Abraham et al., 2018), ацетамиприд (He et al., 2011), форат, пропенофос, изокарбофос (Wang et al., 2012) и пр.

В качестве примера рассмотрим тебуконазол – системный фунгицид для обработки зерновых культур. Он внесен в список потенциальных канцерогенов и несет риск для состояния окружающей среды уже при низких концентрациях. Колориметрическая методика на основе агрегации наночастиц Ag позволила специфично определять тебуконазол в образцах риса за 20 мин (ПО 10 нМ) (Truong et al., 2021).

Другой пример – β-лактамы антибиотики (пенициллины, цефалоспорины и др.), широко используемые в животноводстве, благодаря своей химической стабильности часто загрязняют молочную продукцию. Работа Paniel с соавт. (2017) описывает отбор аптамера к пенициллину G и разработка аптасенсора для его определения в молоке. Для создания электрохимического сенсора авторы иммобилизовали аптамеры на поверхности углеродного электрода. Связывание мишени изменяет свойства поверхностного слоя, что регистрируется количественно в режиме СЭИ (рис. 5А) (ЛД 0.4–1000 мкг/л, ПО 0.17 мкг/л). Показана селективность определения в присутствии родственных пенициллину G антибиотиков, ампициллина и амоксициллина. При этом наблюдался значительный неспецифичный отклик на тетрациклин, что, по мнению авторов, может быть связано с полициклической природой антибиотика и его склонностью к взаимодействию с нуклеиновыми кислотами. Неспецифичный отклик на тетрациклин ставит под вопрос применимость конкретного подхода для анализа реальных объектов и указывает на необходимость учета нюансов при использовании аптасенсоров для конкретных мишеней. Антибиотики наряду с микотоксинами привлекают большое внимание коллективов, занимающихся аптасенсорами. Дополнительная информация по соответствующим разработкам может быть найдена в статьях Mehlhorn с соавт. (2018) и Yue с соавт. (2021).

Пищевые добавки. Эту группу веществ можно проиллюстрировать на примере стимуляторов роста – кленбутерола (КЛБ) и рактопомина, которые добавляют в корм для ускорения набора массы и снижения жирности мяса сельскохозяйственных животных. Аптамер, специфичный к КЛБ, конъюгированный с флуоресцеином, задействован для получения флуоресцентного сенсора, основанного на десорбции аптамеров с поверхности оксида графена при связывании мишени (ЛД 0.10–50 нг/мл, ПО 0.07 нг/мл, рис. 6) (Duan et al., 2017b). Аналогично устроенный аптасенсор, описанный для рактопамина, позволил определять данный аналит в образцах свинины (ЛД 0.10–100 нг/мл, ПО 0.04 нг/мл) (Duan et al., 2017a).

Аптамеры применимы и для определения менее опасных веществ. К примеру, для контроля содержания ванилина в пищевой продукции. Kuznetsov с соавт. (2018) описал аптамер, специфичный к ванилину в присутствии его близких аналогов: бензальдегида, гваякола, фуранеола, этилгвайакола и этилванилина. На основе аптамера разработан электрохимический сенсор, который можно описать схемой, приведенной на рис. 5В. Аптамер с комплементарной электрохимически активной пробой иммобилизован на подложке из Ta₂O₅. При связывании ванилина происходит высвобождение пробы, детектируемое как изменение поверхностного потенциала. При помощи этого сенсора авторы выполнили селективное определение ванилина в

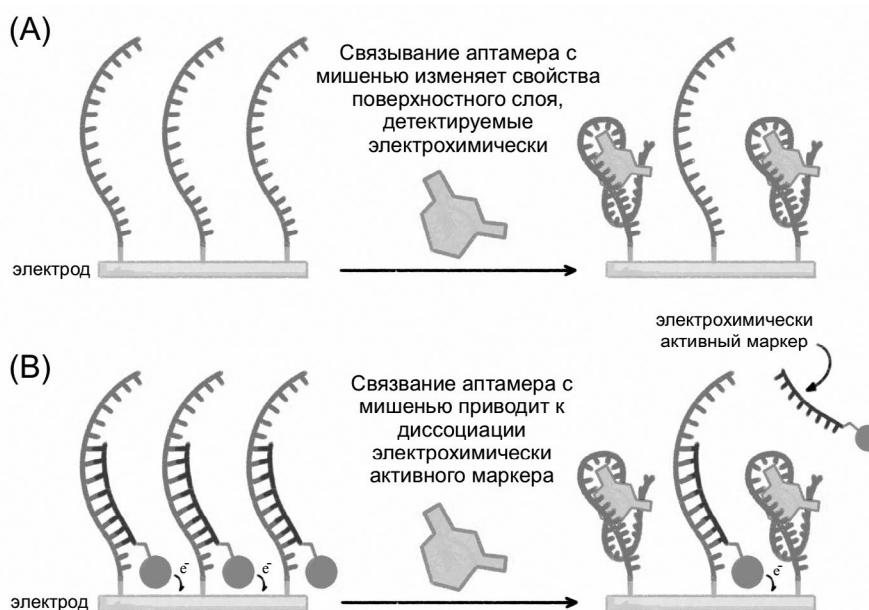


Рисунок 5. Устройство электрохимических аптасенсоров. (А) Электрод, модифицированный аптамерами, для обеспечения специфичного ответа на присутствие мишени. (В) Электрод, модифицированный аптамерами с комплементарной электрохимически активной пробой, диссоциирующей в присутствии мишени. [ориг.]

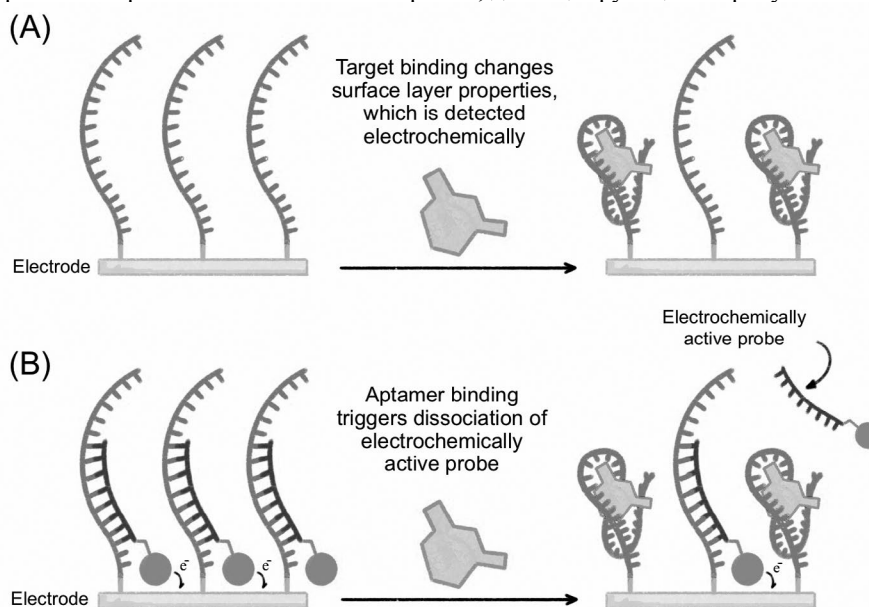


Figure 5. Concepts of electrochemical aptasensors. (A) Aptamer-modified electrode provides specific response in the presence of a target. (B) Aptamer-modified electrode with a complementary electrochemically active probe dissociating upon target binding. [orig.]

смеси альтернативных веществ и в образцах кофейного экстракта (ПО 1.55×10^{-7} М, ЛД $1.55 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-6}$ М).

Прочие вредные органические вещества. Поллютанты в окружающей среде можно разделить на соединения природного и антропогенного происхождения. В качестве примера природного токсина можно привести липополисахариды (ЛПС) – экзотоксины и компоненты внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Авторы работы (Ye et al., 2017) провели отбор аптамеров, специфичных к широкому кругу ЛПС, с использованием ЛПС *Salmonella enterica* серотип *typhimurium* в качестве основной мишени SELEX. Оптимальный аптамер в составе флуоресцентного аптасенсора позволил выявить ЛПС трех различных

видов бактерий в пробах воды (для разных ЛПС ПО 3.00–99.31 нг/мл, ЛД в диапазоне от сотых долей до десятков мкг/мл).

Поллютант антропогенного происхождения ди(2-этилгексил)фталат (ДЭГФ), широко распространённый пластификатор в упаковочных материалах, может вызвать эндокринные нарушения и угнетение иммунитета. Аптамер к молекуле ДЭГФ использован для создания электрохимического аптасенсора на основе СЭИ для прямого обнаружения пластификатора в пробах воды с высокой чувствительностью (ЛД $7.629 - 2 \times 10^6$ пг/мл, ПО 0.103 пг/мл) и специфичностью, а также низкой стоимостью анализа (Lu et al., 2020).

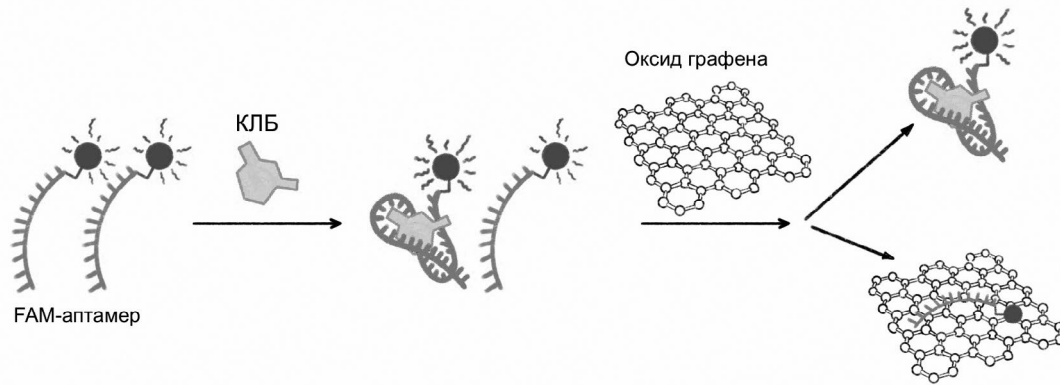


Рисунок 6. Детектирование клербутерола (КЛБ), основанное на десорбции флуоресцентно-меченных аптамеров с поверхности оксида графена при связывании мишени. Оксид графена используется в виде суспензии, разделение осуществляется центрифугированием. Составлено на основе иллюстрации из статьи открытого доступа (Duan et al., 2017b)

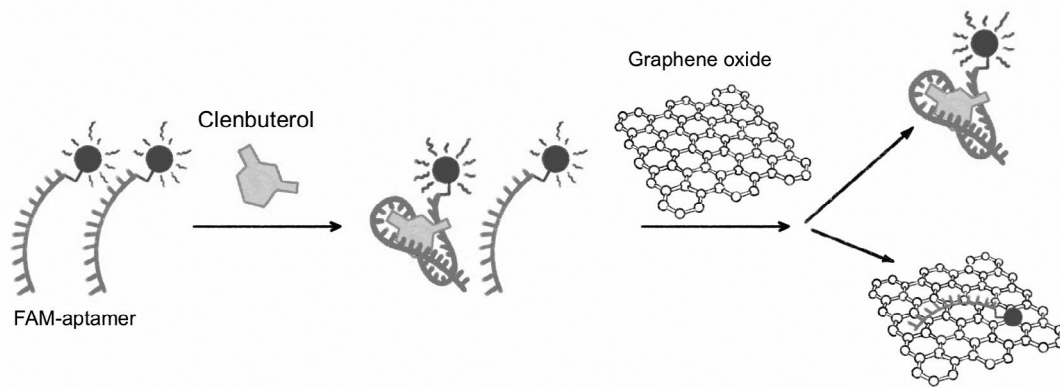


Figure 6. Clenbuterol detection based on desorption of fluorescently labeled aptamers from graphene oxide upon target binding. A suspension of graphene oxide is used, separation is carried out by centrifugation. Based on illustration from an open access article (Duan et al., 2017b)

Аптамеры к катионам металлов

К неотъемлемым задачам химического мониторинга окружающей среды относится определение тяжелых металлов, при проведении которого в первую очередь опираются на спектральные, оптические и электрохимические методы анализа. Практика показывает, что аптасенсоры для ионов металлов не уступают многим классическим аналитическим методикам. Так, аптамер к Hg^{2+} в методике с агрегацией наночастиц Au позволяет визуально фиксировать концентрацию аналита от 8.2×10^{-8} М. В предложенном подходе агрегация наночастиц происходит под действием аптамера в отсутствие мишени, что позволяет избежать негативного влияния неселективной адсорбции аналита на частицах, препятствующей агрегации. Сравнение количественного спектрофотометрического детектирования Hg^{2+} при помощи аптамера в природных образцах воды (ПО 4.9×10^{-11} М) с результатами атомной спектроскопии холодного пара показало согласованность результатов. В этой же работе авторы успешно привлекли эту методику для определения Ag^+ (визуальный ПО 1.0×10^{-8} М, колориметрический ПО 6.4×10^{-10} М) (Qi et al., 2019). Аналогичная методика описана и для Cd^{2+} (ПО 4.6 нМ) (Wu et al., 2014).

Аптамеры к патогенным микроорганизмам

Патогенные бактерии, присутствующие в пищевой продукции, становятся причиной многих серьезных, зачастую смертельных, заболеваний (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Vibrio spp.* etc.). (Davydova et al., 2016; Majdinasab et al., 2018). Помимо бактерий, патогенных для человека, немаловажна и проблема фитопатогенных микроорганизмов. Грибные и бактериальные болезни растений наносят огромный урон сельскому хозяйству, а токсичные продукты их жизнедеятельности – здоровью человека и животных (FAO, 2020). Микробиологические методы, основанные на идентификации выделенных культур по культурально-морфологическим признакам, занимают много времени и ресурсов. Также для идентификации микробов получили большое распространение ПЦР и ИФА. При этом последний имеет ограниченное применение, специфичность и чувствительность. В этом отношении ПЦР оказывается более эффективным подходом для диагностики патогенов, однако процедура ресурсозатратна и требует привлечения квалифицированного персонала (Davydova et al., 2016; Majdinasab et al., 2018).

Технология SELEX позволяет получать аптамеры, специфичные к молекулам клеточных оболочек микроорганизмов (Davydova et al., 2016; Majdinasab et al., 2018), и использовать их для создания специфичных сенсоров. Такие

примеры описаны для *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter* spp., *Listeria* spp. и *Shigella flexneri*. Для выявления бактерий задействованы те же принципы дизайна аптасенсоров, что и для молекул, рассмотренных выше. Флуоресцентные и электрохимические аптасенсоры обеспечивают более высокую чувствительность, в то время как колориметрические методики и тест-полоски эффективны для экспресс-диагностики (Majdinasab et al., 2018). В качестве примера рассмотрим гибридную методику для одновременного детектирования *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* и *S. enterica* серотип *typhimurium*. Клетки бактерий связываются при помощи магнитных наночастиц, покрытых антителами. Параллельная детекция осуществляется при помощи смеси 4 аптамеров, конъюгированных с разными флуоресцентными квантовыми

точками (рис. 7). Пределы обнаружения *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes* и *S. enterica* серотип *typhimurium* составляли 80, 100, 47 и 160 КОЕ/мл соответственно в чистой культуре и 320, 350, 110 и 750 КОЕ/мл в говяжьем фарше. Аптасенсор позволяет детектировать бактериальные клетки в диапазоне 10^1 – 10^4 КОЕ/мл (Xu et al., 2015).

В работе Krivitsky с соавт. (2021) описано применение аптамеров для определения уредоспор возбудителя ржавчины сои (*Phakopsora pachyrhizi*) в воздухе. Споры улавливают с помощью устройства для сбора воздуха с углеродным фильтром, выполняющим функции электрода (рис. 8). После сбора пробы на электрод наносится биотинилированный аптамер, специфичный к белкам спор возбудителя ржавчины сои. После связывания аптамеров с мишенью электрод инкубируется с конъюгатом стрептавидина и щелочной фосфатазы. Иммуобилизованный на

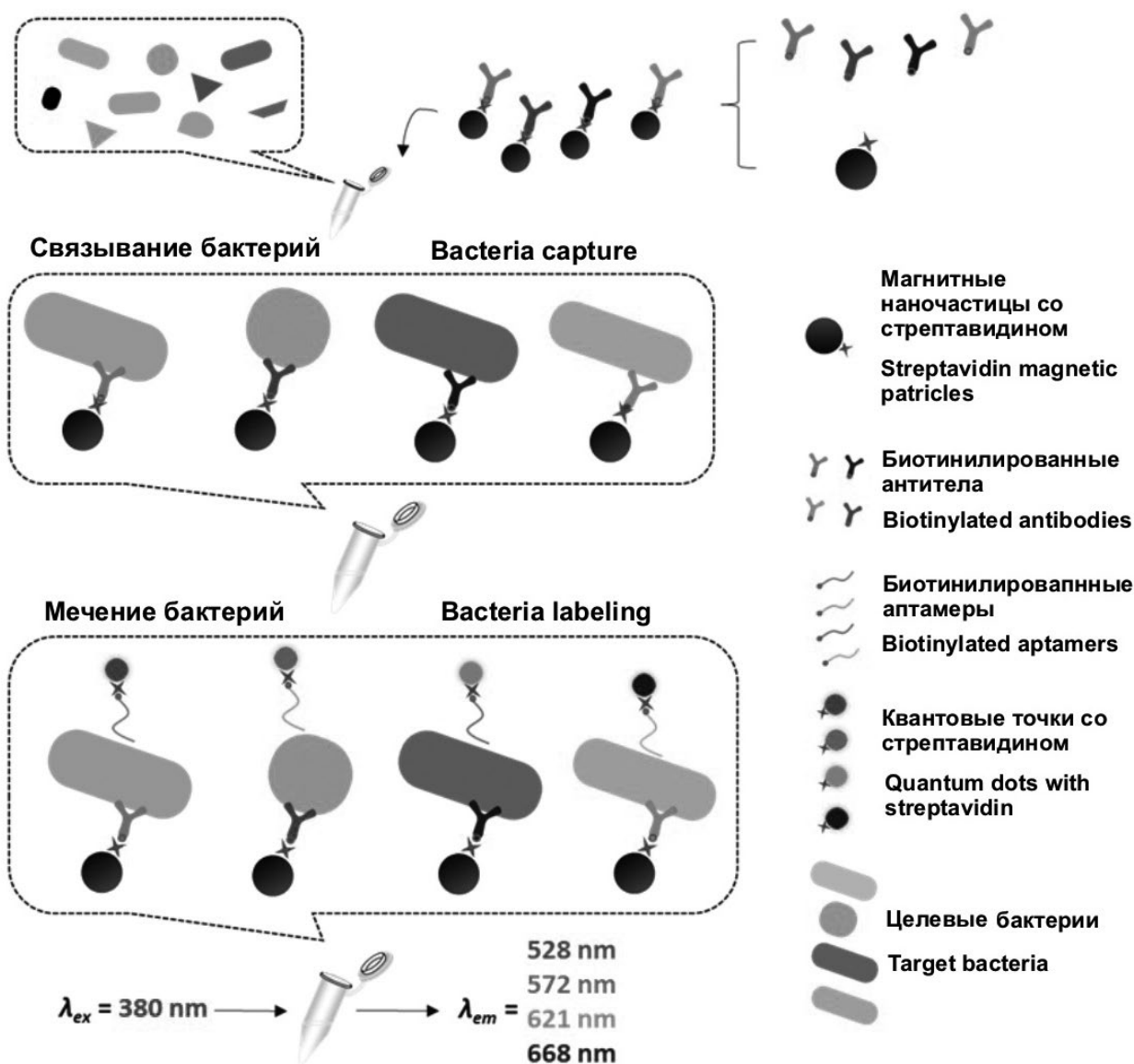


Рисунок 7. Процесс параллельного детектирования 4 патогенных бактерий при помощи антител, аптамеров и флуоресцентных квантовых точек (Xu et al., 2015). Воспроизведено с согласия правообладателя. © American Society of Agricultural and Biological Engineers

Figure 7. The process of simultaneous detection of 4 pathogenic bacteria species using antibodies, aptamers, and fluorescent quantum dots. From (Xu et al., 2015). Used with the copyright holder permission. © American Society of Agricultural and Biological Engineers

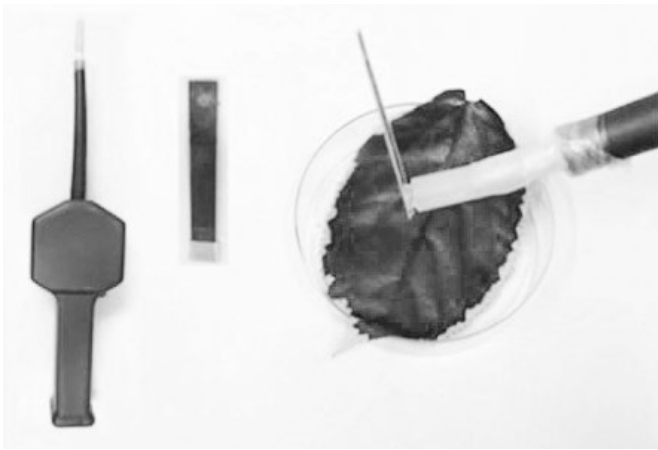


Рисунок 8. Портативное устройство для сбора спор ржавчины сои для последующего определения при помощи аптамера. Иллюстрация из статьи открытого доступа (Krivitsky et al., 2021)

Figure 8. Portable device for collection of soybean rust spores for subsequent aptamer-assisted determination. Illustration from an open access article (Krivitsky et al., 2021)

аптамере фермент катализирует превращение *n*-нитрофенилфосфата в *n*-нитрофенол, выступающий в качестве электрохимически активного маркера. При тестировании специфичности системы в отношении *P. pachyrhizi*, а также филогенетически близкого вида *P. meibomiae*, была продемонстрирована высокая избирательность в отношении именно целевого объекта (уредоспоры *Phakopsora pachyrhizi*). Устройство позволяет осуществлять быстрый сбор образца с последующим обнаружением спор фитопатогена (около 2 минут). Максимальная чувствительность прибора составила около 10 спор на электрод (диаметр электрода 4 мм). Авторы отмечают, что чувствительность потенциально можно повысить, увеличивая время инкубации с ферментом. Предложенное устройство может быть адаптировано для раннего обнаружения возбудителей болезней растений, распространяющихся по воздуху.

Коммерческие продукты на основе аптамеров

Несмотря на многообещающие результаты лабораторных испытаний, сведений об успешной коммерциализации продуктов на основе аптамеров в настоящее время не много. Это можно объяснить, как относительной новизной

самой технологии, так и доступностью устоявшихся подходов. Тем не менее, расширяется список компаний, которые занимаются получением аптамеров к любым мишеням и адаптацией методов их использования. Список некоторых компаний опубликован на портале «International Society on Aptamers» (McKeague et al., 2021). На данный момент одна из областей пищевой отрасли, в которой появлялись коммерческие разработки – это диагностика микотоксинов.

Так «OTA-Sense» (Neoventures Biotechnology Inc., Канада) – это набор для флуоресцентного определения ОТА. Набор состоит из аффинной колонки, модифицированной аптамерами к ОТА, и раствора для детектирования. Колонка позволяет провести предварительную концентрацию токсина из пробы. Раствор для детектирования содержит ОТА-специфичный аптамер и катионы Tb^{3+} . Катион металла взаимодействует с комплексом ОТА-аптамер, при этом люминесценция Tb^{3+} увеличивается в несколько раз. Набор предназначен для определения ОТА в зерне и алкогольных напитках. «AflaSense» – аналогичный набор этой же компании для определения АФВ1 в образцах кукурузы и арахиса (Kaur et al., 2018). Другое устройство с похожим названием, «AflaSense Plus» (Nanoelectronics and MEMS laboratory, НЕСТЕС, Тайланд) – портативный электрохимический детектор для определения АФВ1. Процедура анализа состоит из экстракции образца, инкубации экстракта с реагентом с последующим нанесением раствора на тонкий одноразовый электрод на основе графена в виде пластинки (рис. 9) («AflaSense Plus: Rapid and Portable...», 2016). Электрохимическая платформа универсальна и может быть легко адаптирована для других мишеней с помощью подходящего аптамера. Аналогичная портативная электрохимическая система предложена компанией Cibus Biotechnologies Inc. (США). Система CibusDx обеспечивает получение результатов на месте в течение 30 мин. Круг анализов пока не уточняется. Как и «AflaSense Plus», эта система основана на использовании тонких одноразовых электродов, за исключением того, что в этом случае анализирующий прибор более миниатюрен и может быть соединен с мобильными устройствами («CibusDx technology shifts...», 2017). Все вышеперечисленные проекты в настоящий момент, вероятно, испытывают затруднения или не активны. Тем не менее приведенные примеры, несомненно, представляют историческую ценность в качестве прототипов коммерческих технологий, которые, мы надеемся, однажды станут частью биоаналитической практики.

Аптамеры как индивидуальные биологически активные агенты

Пестициды на основе аптамеров

Помимо рассмотренной выше проблемы загрязнения окружающей среды пестицидами, все более реальной становится угроза экспансии патогенов, резистентных к широко распространенным препаратам. В связи с этим необходим поиск новых решений для контроля фитопатогенов (Rani et al., 2021). Предполагается, что аптамеры могут быть привлечены в качестве средств защиты растений за счет целенаправленного действия на выбранные молекулярные мишени, ответственные за жизненно важные функции вредного организма. Высокий уровень специфичности таких препаратов позволяет избежать нецелесообразной токсичности. Более того, деградация НК-аптамеров

и белковых аптамеров в окружающей среде происходит естественным способом и не продуцирует опасных побочных продуктов (Ha et al., 2016; Colombo et al., 2020). Накоплен обширный опыт отбора аптамеров к биомолекулам животных и человека (Dunn, 2014), тем не менее, до сих пор в литературе представлено мало примеров аптамеров, ингибирующих те или иные функции патогенов. Стоит ожидать, что рутинизация технологий отбора и применения аптамеров, изменит эту ситуацию.

Проиллюстрируем логику использования аптамеров в качестве пестицидов на примере бактерии *Xanthomonas axonopodis* патовар *citri*, этиологического агента рака цитрусовых. Заболевание вызывает дефолиацию, приводит к

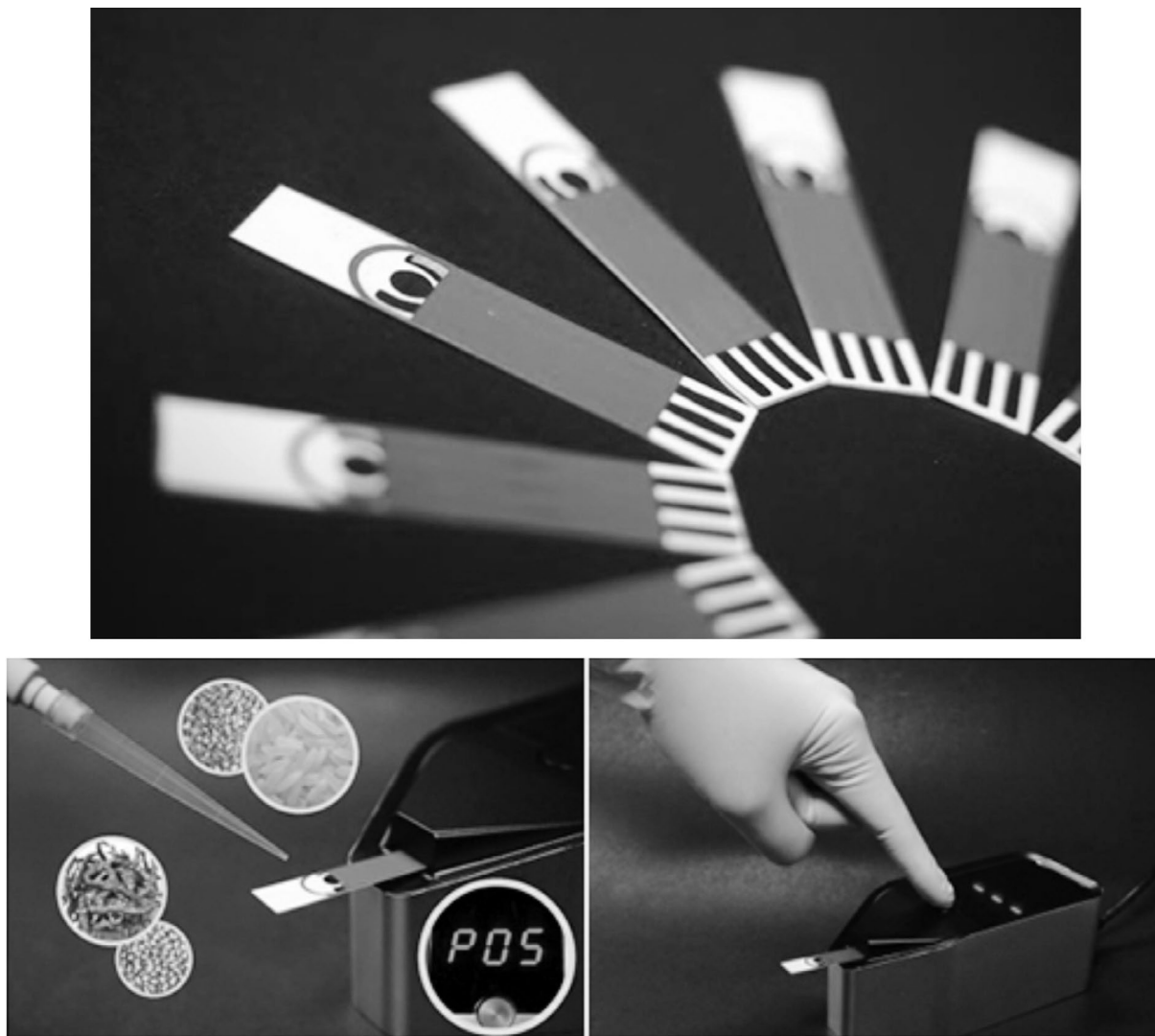


Рисунок 9. Электрохимическая система для детектирования охратоксина А, «AflaSense Plus». Сверху – фотография тонких одноразовых электродов на основе графена. Снизу – портативное регистрирующее устройство в процессе анализа. Источник («AflaSense Plus: Rapid and Portable...», 2016). Воспроизведено с согласия правообладателя.
© National Electronics and Computer Technology Center

Figure 9. Electrochemical system for ochratoxin A detection, “AflaSense Plus”. At the top: thin disposable graphene electrodes. Below: a portable recording device and the process of analysis. Source (“AflaSense Plus: Rapid and Portable...”, 2016). Used with the copyright holder permission. © National Electronics and Computer Technology Center

ухудшению качества плодов и их преждевременному опаданию. Внесение бактерицидных агентов ингибирует рост и препятствует распространению бактерий, но эффективных препаратов, способных справиться с болезнью в прогрессирующей стадии, не существует (Ha et al., 2016). Для решения этой проблемы предложен ДНК-аптамер к цитоскелетному белку FtsZ (Ha et al., 2016). Это главный белок в цитокinesis механизме деления прокариотических клеток, следовательно, ингибитор FtsZ может нарушить процесс деления. Авторами описано выделение FtsZ из *X. axonopodis* с последующим отбором ДНК-аптамеров к этому белку. Полученные аптамеры имеют K_d в наномолярном диапазоне. Идентифицировано три олигонуклеотида, проявляющих сильное ингибирование полимеризации FtsZ *in vitro*. В качестве оценки эффективности авторы приводят концентрацию полумаксимального ингибирования (IC_{50}) полимеризации белка. Для трех аптамеров величина IC_{50} составила 1–2 мкМ. Аналогичное значение IC_{50} было получено для берберина, коммерческого

антибактериального препарата. Аптамеры также показали высокую ингибирующую активность в бактериальных культурах со значениями MIC_{50} (минимальная концентрация, подавляющая рост 50% организмов) на уровне 100 мкМ (Ha et al., 2016).

Аналогичный подход создания апта-пестицида можно перенести и на другие группы организмов. Так, для борьбы с патогеном *Plasmopara viticola*, вызывающим ложную мучнистую росу винограда, предложен пептидный аптамер NoPv1 («No *Plasmopora viticola* 1»), состоящий из 8 аминокислотных остатков (Colombo et al., 2020). Для отбора была задействована дрожжевая двугибридная система с целлюлозосинтазой 2 в качестве мишени (PvCesA2) *P. viticola*, ингибирование которой нарушает процесс образования зародышевой трубки патогена и развития инфекции (Colombo et al., 2020). Преимущество отбора в двугибридной дрожжевой системе заключается в получении аптамеров, взаимодействующих с белком-мишенью в живых клетках, в отличие от систем отбора *in vitro* (фаговый

дисплей и др.). Активность отобранных аптамеров протестирована путем инокуляции листовых дисков винограда *Vitis vinifera* культурой *P. viticola* в присутствии 200 мкМ NoPv1. Аптамер позволил предотвратить поражение листовых дисков на 100%, не вызывая повреждения растительных тканей (рис. 10). В отсутствие NoPv1 через 5–7 дней после инокуляции четко фиксировалась споруляция *P. viticola*. В опытах на горшечных культурах винограда 800 мкМ NoPv1 также эффективно подавлял развитие патогена, как и коммерческий фунгицид на основе соединения меди Kocide 2000. Раствор аптамера распыляли на листовые диски до (от 7 дней до 2 ч) и после (от 1 ч до 2 дней) инокуляции. NoPv1 эффективно подавлял инфекцию даже при обработке за 7 дней до инокуляции, однако его эффективность быстро снижалась при нанесении после инокуляции (Colombo et al., 2020). Также показано, что NoPv1 способен противодействовать росту культуры *Phytophthora infestans* в чашке Петри. Авторы объясняют это высоким сходством аминокислотных последовательностей между белками целлюлозосинтазы *P. viticola* и *P. infestans*. Дополнительные исследования продемонстрировали, что применение аптамера не влияет на рост целевых микроорганизмов и что пептид не проявляет токсического действия по отношению к клеткам растений и человека (Colombo et al., 2020).

Еще один пептидный аптамер SNP-D4 с фунгицидной активностью нацелен на кальмодулин CaM гриба *Pyricularia oryzae*, вызывающего пирикулярриоз риса (Xu et al., 2019). Аптамер получен при помощи бактериальной двугибридной системы с CaM в качестве мишени. CaM служит регулятором Ca²⁺-сигнальных путей, важных для патогенеза. Конидиальную суспензию инкубировали в присутствии аптамера и изучали развитие патогена. Степень подавления прорастания спор коррелировала с концентрацией SNP-D4. Авторы показали, что эффект SNP-D4 с концентрацией 10 мкМ равен таковому для 0.01% раствора фунгицида трициклазола (Xu et al., 2019).

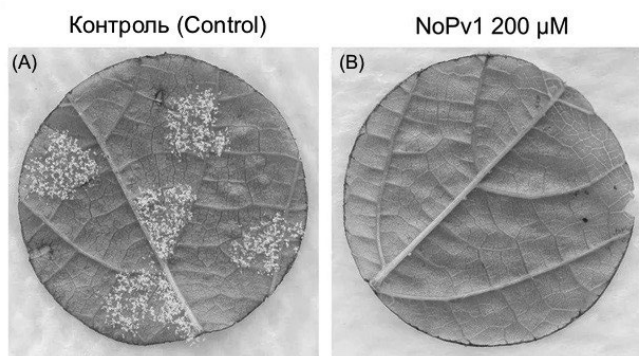


Рисунок 10. Изображения дисков листьев винограда, совместно инокулированных *ex vivo* культурой *Plasmopara viticola*. (B) – в присутствии пептидного аптамера NoPv 1, (A) – контроль без обработки аптамером. Иллюстрация из статьи открытого доступа (Colombo et al., 2020)

Figure 10. Images of vine leaf disks co-inoculated *ex vivo* with a *Plasmopara viticola* culture. (B) – in presence of NoPv 1 peptide aptamer, (A) – control without aptamer treatment. Illustration from an open access article (Colombo et al., 2020)

Приведенные примеры иллюстрируют потенциал НК-аптамеров и пептимеров в качестве эффективных пестицидов, ингибирующих те или иные функции патогенных микроорганизмов. Тем не менее, в сравнении с биоаналитическими направлениями, исследования в этой области довольно скудны. Необходимо дальнейшее накопление опыта, касающегося не только тестирования активности аптамеров *in vitro* и *in vivo*, но и эффективности полевого применения, биодоступности и биостабильности таких препаратов.

Антивирусные препараты

В отличие от грибов и бактерий, против вирусов растений нет эффективных пестицидов. Попытки обеспечить устойчивость растений к вирусным инфекциям, как правило, основаны на РНК-интерференции и редактировании генома (Sera, 2017). Аптамеры открывают новое направление для создания растений, резистентных к вирусным заболеваниям за счет направленного ингибирования важных функциональных белков вирусов и нарушения их репликационного цикла (Sera, 2017).

Первое применение пептимеров в этом направлении относится к вирусу пятнистого увядания томатов (TSWV) (Rudolph et al., 2003). Для отбора аптамеров авторы воспользовались фрагментами нуклеопротеина TSWV, гомополимеризация которого необходима для цикла развития вирусной инфекции. Пептидные аптамеры к нуклеопротеину были отобраны из рандомизированной библиотеки с использованием дрожжевой двугибридной системы. В результате эксперимента получен пептид из 29 аминокислот. Пептид конъюгировали с β-глюкуронидазой в качестве белка-носителя. Исследование аффинности конъюгата показало сильное взаимодействие с нуклеопротеином TSWV, а также с нуклеопротеинами других тосповирусов: вируса хлоротической пятнистости томата (TCSV), вируса кольцевой пятнистости арахиса (GRSV), вируса некроза побегов хризантем (CSNV) и вируса некротической пятнистости бальзамина (INSV). Активность аптамера протестирована *in planta* посредством получения трансгенных растений, экспрессирующих разработанный конъюгат. Многие трансгенные линии демонстрировали полную устойчивость без видимых симптомов заболевания при заражении TSWV (рис. 11). При этом все инокулированные контрольные линии проявляли симптомы и в конечном итоге погибали. Трансгенные линии продемонстрировали устойчивость и к другим тосповирусам (TCSV, GRSV и CSNV, но не INSV), что согласуется с результатами экспериментов в дрожжевой двугибридной системе. Такой результат демонстрирует возможность создания растений с широким спектром противовирусной устойчивости благодаря аптамерам к высоко консервативным белкам вирусов.

В другой работе белковые аптамеры были получены к репликационному белку AL1 вируса золотой мозаики томатов (TGMV) (Lopez-Ochoa et al., 2006), для отбора также применялась дрожжевая двугибридная система. Некоторые аптамеры препятствовали репликации TGMV в эксперименте с использованием протопластов, выделенных из суспензионных клеток *Nicotiana tabacum* (BY-2). Тем не менее, устойчивость к TGMV *in planta* не изучалась. Эксперимент в дрожжевой двугибридной системе показал аффинность отобранных пептидов не только к AL1 TGMV,

но и к аналогичному белку вируса курчавости капустных листьев (CaLCuV).

Продолжая опыты с пептимерами к AL1 TGMV, Reyes с соавт. (2013) исследовал связывание 16 пептидных аптамеров с репликационными белками, девяти вирусов из трех основных родов *Geminiviridae*. Анализ в дрожжевой двугибридной системе показал, что два пептимера (A22, A64) не только имели высокий уровень связывания с белком AL1 TGMV, но взаимодействовали и с репликационными белками, полученными из других геминивирусов. Эти пептимеры были экспрессированы в растениях томата *Solanum lycopersicum* (рис. 12), после чего была исследована устойчивость трансгенных растений к вирусу желтой курчавости листьев томата и вирусу крапчатости листьев томата (TYLCV и ToMoV). Показано, что трансгенные линии эффективно задерживают накопление вирусной ДНК в сравнении с растениями дикого типа.

На сегодняшний день опыт применения пептимеров для борьбы с вирусными инфекциями растений исчерпывается вышеперечисленными публикациями. Работы, посвященные применению НК-аптамеров в этом направлении, вовсе отсутствуют. Позитивные результаты рассмотренных исследований представляют собой благоприятную почву для проведения дальнейших работ и детального изучения возможностей аптамеров как агентов для борьбы с фитовирусами.

Воздействие на биохимические процессы в растениях

Отбор аптамеров к функциональным белкам растений может быть использован и для направленного регулирования метаболических процессов, изменения фенотипа



Рисунок 11. Инокулированные TSWV растения, 23 дня после инокуляции. (А) – Дикий тип. (В) – Тип, экспрессирующий немодифицированную глюкоуридазу. (С) – Тип, экспрессирующий конъюгат аптамера с глюкоуридазой. Иллюстрация из статьи открытого доступа (Rudolph et al., 2003)

Figure 11. TSWV-inoculated plants, 23 days post-inoculation. (A) – Wild type. (B) – Type expressing unmodified glucuronidase. (C) – Type expressing aptamer-glucuronidase conjugate. Illustration from an open access article (Rudolph et al., 2003)

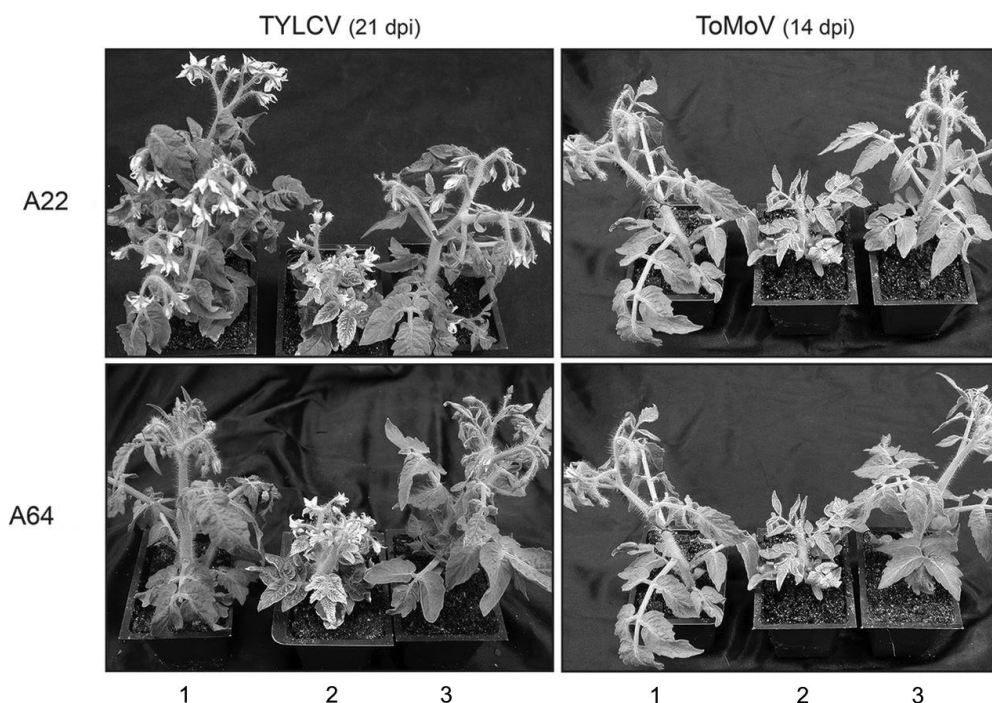


Рисунок 12. Изучение эффективности пептимеров (A22, A64), экспрессируемых томатами, в отношении TYLCV и ToMoV. 1 – контроль без инокуляции. 2 – инокулированные растения дикого типа. 3 – инокулированные трансгенные растения на 21 день после инокуляции TYLCV и на 14 день после инокуляции ToMoV. Иллюстрация из статьи открытого доступа (Reyes et al., 2013)

Figure 12. Efficacy of tomato-expressed pептимеров (A22, A64) against TYLCV and ToMoV. 1 – control without inoculation. 2 – inoculated wild-type plants. 3 – inoculated transgenic plants on day 21 post TYLCV inoculation (dpi) and on day 14 after ToMoV inoculation. Illustration from an open access article (Reyes et al., 2013)

и изучения молекулярно-биологических процессов. Так, описан пептидный аптамер PAP, содержащий 16 аминокислот и препятствующий работе функционального белка MAGO NASHI (OsMAGO) в растениях риса — ключевого компонента в комплексе сшивания экзонов (Exon junction complex, EJC) (Gong et al., 2014). Аптамер PAP был идентифицирован путем скрининга библиотеки пептидов в дрожжевой двугибридной системе с использованием OsMAGO1 в качестве мишени. Несмотря на отсутствие позитивного эффекта от ингибирования OsMAGO, воздействие на него ярко отражается на фенотипе растения, иллюстрируя потенциальные возможности применения

данной технологии. Фенотипический анализ показал, что трансгенные линии, экспрессирующие PAP, были карликовыми, с дефектными цветами и тычинками, более того, они характеризовались чрезвычайно низкой продуктивностью. Этот результат указывает на то, что конкурентное связывание PAP с MAGO дестабилизирует функцию гетеродимера MAGO-Y14 в рисе. Применение аптамера PAP показывает, что пептидные аптамеры представляют собой альтернативный подход к функциональной геномике высших растений, выступая в качестве ингибиторов и модуляторов активности целевых белков.

Нанодобрения с использованием аптамеров

В наши дни сельское хозяйство столкнулось с серьезными последствиями чрезмерного и малоэффективного применения минеральных удобрений. По некоторым оценкам, при их внесении в почву, около 40–60% азота не усваиваются растениями. Аналогичная проблема наблюдается для фосфора (не усваивается 80–90%) и калия (не усваивается 30–50%) (Aziz et al., 2019). Излишки удобрений вымываются из почвы с дождями и в процессе орошения, попадают в грунтовые воды, приводя к загрязнению воды и неконтролируемому росту микроорганизмов. Избытки азота могут высвобождаться в форме нитратов, газообразного аммиака и оксидов азота (Aziz et al., 2019).

Одна из популярных концепций при разработке инновационных удобрений, позволяющих повысить усвоение, обеспечить адресную доставку и постепенное высвобождение питательных веществ – это микроинкапсулирование с использованием «умных» материалов. В настоящее время предложены системы инкапсулирования, в которых высвобождение веществ происходит в зависимости от pH, температуры или бактериального воздействия. Синхронизация поступления питательных веществ с потребностями сельскохозяйственных культур может повысить эффективность использования удобрений без негативного влияния на урожайность (Aziz et al., 2019). Существующие подходы к созданию инкапсулированных нанодобровений с добавлением гидрогелей, наночастиц глины и хитозана направлены в большей степени на пролонгированное высвобождение, нежели на адресное высвобождение. Технология аптамеров может стать полезным инструментом для разработки новых капсул, обеспечивающих адресную доставку и высвобождение питательных веществ.

Известно, что культурные растения посылают сигналы голодания, выделяя в окружающую почву определенные биомаркеры: аминокислоты, органические кислоты, углеводы и фенольные соединения и т.д. Аптамеры, чувствительные к таким биомаркерам, могут применяться в качестве спускового механизма, высвобождающего питательные вещества. Концепция такой системы

проиллюстрирована на рисунке 13 (Mastronardi, 2017). Олигонуклеотидные аптамеры встроены в многослойные полиэлектролитные капсулы (polyelectrolyte multilayer, PEM). Небольшие молекулы, такие как корневые экссудаты, могут диффундировать внутрь PEM, связываясь с аптамерами, стимулируя деформацию слоев PEM. Таким образом, присутствие биомаркера вызывает изменение проницаемости частицы, позволяя инкапсулированному источнику питательных веществ высвобождаться (Mastronardi, 2017). Стоит отметить, что аналогичный подход может быть задействован для контролируемого высвобождения пестицидов и гербицидов.

В диссертации Foster (2013) описан дизайн такой капсулы на основе аптамера к сульфородамину в качестве модельного соединения. Для создания PEM использована комбинация хитозана и гиалуроновой кислоты. Исследование свойств этой системы показало сохранение связывающих свойств аптамера, включенного в PEM. Аналогичное исследование описано в диссертации Sultan (2011), посвященной полиэлектролитным капсулам, чувствительным к присутствию растительного биомаркера L-лизина. В работе показано сохранение связывающей активности аптамера в составе капсулы и изменение проницаемости капсулы при связывании лизина. Также описаны микрокапсулы, чувствительные к присутствию L-серина (Mastronardi, 2017). Иные принципы разработки «умных» материалов, имеющих потенциал для доставки и контролируемого высвобождения удобрений, описаны в обзоре Mastronardi с соавт. (2014).

Несмотря на привлекательность описанной концепции, на практике пока отсутствуют завершенные работы, описывающие применение нанодобровений с использованием аптамеров в полевых условиях. При этом в существующих работах не исследуется вопрос эффективности таких микрокапсул непосредственно для удобрения растений, так что описанные материалы скорее обозначают направление будущих исследований, чем их результаты.

Заключение

Олигонуклеотидные и пептидные аптамеры зарекомендовали себя как перспективный инструмент для решения разнообразных прикладных задач, в которых требуется прочное и селективное связывание определенной молекулярной мишени. Будучи аналогами антител, аптамеры имеют целый ряд преимуществ, что делает их привлекательной основой для развития альтернативных

технологий. За 30 лет развития этой области накоплен большой объем информации о привлечении аптамеров для создания биологически активных агентов, биоаналитических методик и средств биовизуализации, а также технологий адресной доставки (Dunn, 2014).

Биоаналитическое применение аптамеров изучено наиболее подробно и имеет большой потенциал для

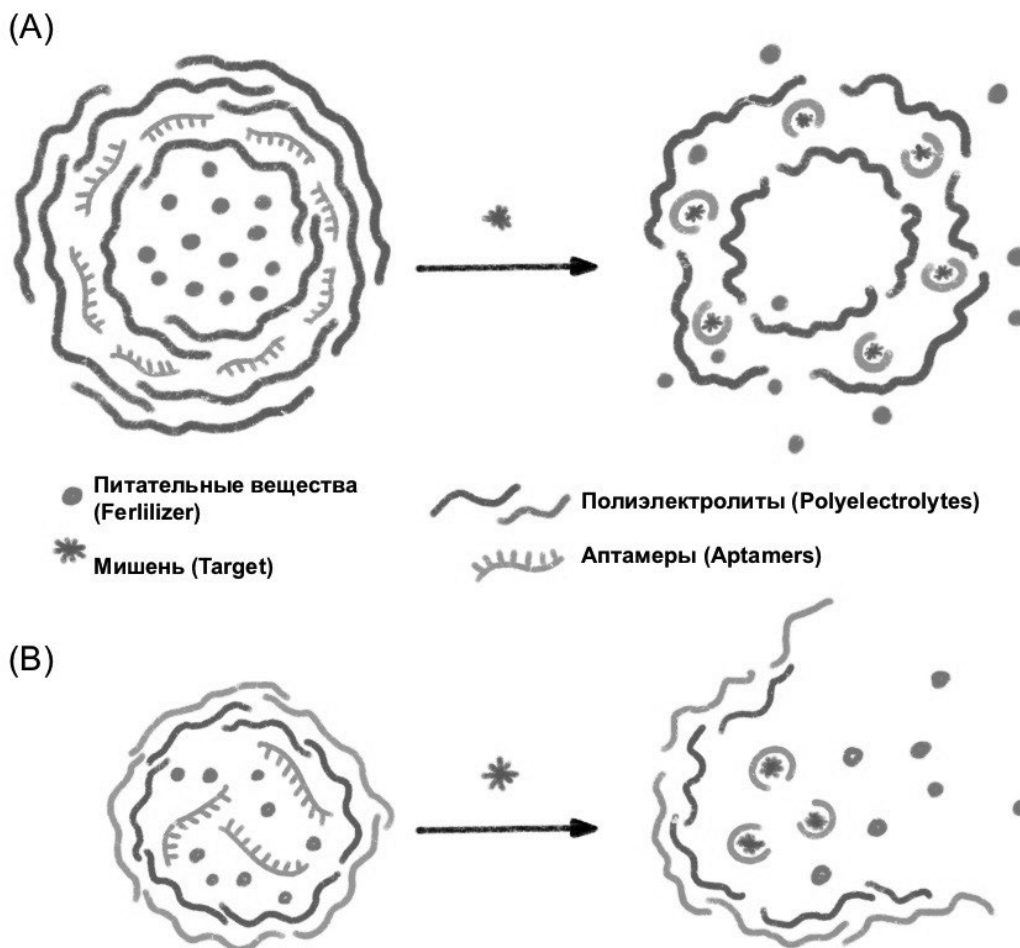


Рисунок 13. Концепция микроконтейнеров для удобрений на основе полиэлектролитных многослойных капсул (PEM), содержащих аптамеры. (А) Включение аптамеров в PEM позволяет регулировать проницаемость капсулы при связывании мишени. (В) Связывание аптамеров с мишенью стимулирует раскрытие капсулы. Составлено на основе иллюстрации из статьи открытого доступа Mastronardi (2017)

Figure 13. The concept of aptamer-modified fertilizer microcontainers based on polyelectrolyte multilayers (PEM).

(A) Incorporation of aptamers into PEM allows regulation of capsule permeability upon target binding.

(B) Aptamer binding to the target stimulates capsule eruption.

Based on illustration from an open access article (Mastronardi, 2017)

агропромышленного комплекса. Наиболее широкое применение в этой области находят НК-аптамеры, тогда как примеры использования пептидных аптамеров малочисленны. Многократно подтверждено, что аптасенсоры показывают хорошие аналитические характеристики и позволяют определять неорганические вещества, органические молекулы и даже определённые микроорганизмы в многокомпонентных образцах (Tombelli et al., 2007; Piiuk et al., 2011; Evtugyn, Nianik, 2019; Goud et al., 2020). Активно развиваются компании, занимающиеся отбором аптамеров и дизайном биоаналитических методик на заказ. Несмотря на видимую доступность технологии, до сих пор реализовано не так много коммерческих тест-систем на основе аптамеров, и подавляющее большинство предложенных продуктов не активно в настоящий момент. Тому можно найти ряд причин: от несовершенности технологии SELEX и проблем, связанных с применением аптамеров, до необходимости крупных инвестиций в новую технологию и частичного отказа от производства антител (занимающих значительную долю рынка), что может быть нецелесообразно по экономическим соображениям. Тем не

менее, технологии на основе аптамеров активно развиваются, вместе с ними неуклонно растёт и соответствующая индустрия, а значит, в будущем можно ожидать расширения области применения аптасенсоров.

Привлечение аптамеров в качестве биологически активных агентов, пестицидов нового поколения, равно как и для создания ГМ-растений, устойчивых к вирусным инфекциям, исследовано относительно мало. Большинство примеров в этой области описывает пептидные аптамеры. Имеются свидетельства об успешном использовании аптамеров для разработки фунгицидных, бактерицидных и противовирусных агентов, демонстрирующих высокую эффективность *in vitro* и *in planta*. Тем не менее, трудно говорить об эффективности этих технологий в полевых условиях. В литературе недостаточно информации о фитотоксичности этих средств, побочных эффектах и о практических аспектах биостабильности и биодоступности предложенных агентов.

Ещё меньше информации опубликовано относительно наноудобрений с использованием аптамеров: концепция капсул с проницаемостью регулируемой аптамерами

разработана в недостаточной степени, отсутствуют данные о практическом применении таких удобрений. Несмотря на малое количество информации в этой области, мы считаем, что это направление перспективно для новых исследований. Аптамеры безусловно имеют потенциал для обновления сельскохозяйственных технологий. Проблемы применения аптамеров на практике, связанные с недостаточной селективностью, потерей свойств *in vivo*, низкой биостабильностью и биодоступностью, могут быть решены за счет гибкости технологии и разнообразных путей для ее модификации.

Подводя итоги, можно заключить, что аптамеры зарекомендовали себя как многоплановый инструмент

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-76-30005).

Авторы выражают благодарность правообладателям изображений Adisorn Tuantranont (National Electronics and Computer Technology Center) и Glenn Laing (American Society of Agricultural and Biological Engineers) за разрешение воспроизведения иллюстраций.

Библиографический список (References)

- Abraham KM, Roueinfar M, Ponce AT, Lussier ME et al (2018) In Vitro Selection and Characterization of a Single-Stranded DNA Aptamer Against the Herbicide Atrazine. *ACS Omega* 3(10): 13576–13583. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01859>
- AflaSense Plus: Rapid and Portable Aflatoxin Sensor. NECTEC. <https://www.nectec.or.th/en/innovation/product-innovation/aflasense.html> (2016)
- Allen G, Andres J (2010) Method of Mycotoxin Detection. Invention patent US20110306508A1
- Apta-Index™. Aptagen. <https://www.aptagen.com/apta-index/> (2019)
- Aziz MZ, Naveed M, Abbas T, Siddique S et al (2019) Alternative Fertilizers and Sustainable Agriculture. In: Farooq M, Pisante M (eds) *Innovations in Sustainable Agriculture*. Springer International Publishing, Cham, 213–245. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23169-9_8
- Bennett JW, Klich M (2003) Mycotoxins. *Clin Microb Rev* 16(3): 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Chen X, Huang Y, Duan N, Wu S, et al (2013) Selection and identification of ssDNA aptamers recognizing zearalenone. *Anal Bioanal Chem* 405(20): 6573–6581. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7085-9>
- Chen X, Huang Y, Duan N, Wu S et al (2014) Selection and characterization of single stranded DNA aptamers recognizing fumonisin B1. *Microchim Acta* 181(11–12): 1317–1324. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1260-3>
- Chen X, Huang Y, Duan N, Wu S et al (2014) Screening and identification of DNA aptamers against T-2 toxin assisted by graphene oxide. *J Agr Food Chem* 62(42): 10368–10374. <https://doi.org/10.1021/jf5032058>
- CibusDx technology shifts safety paradigm from responding to food contamination to prevention. Cibus Biotechnologies, Inc. <https://cibusbiotechnologies.com/2017/08/14/cibusdx-technology-shifts-safety-paradigm-from-responding-to-food-contamination-to-prevention/> (2020)
- Colombo M, Masiero S, Rosa S, Caporali E et al (2020) NoPv1: a synthetic antimicrobial peptide aptamer targeting the causal agents of grapevine downy mildew and potato late blight. *Sci Rep* 10(1): 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73027-x>
- Cruz-Aguado JA, Penner G (2008) Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer. *J Agr Food Chem* 56(22): 10456–10461. <https://doi.org/10.1021/jf801957h>
- Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, Ruml T (2014) Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol Adv* 33(6): 1141–1161. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.008>
- Davydova A, Vorobjeva M, Pyshnyi D, Altman S et al (2016) Aptamers against pathogenic microorganisms. *Crit Rev Microbiol* 42(6): 847–865. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1070115>
- Duan N, Gong W, Wu S, Wang Z (2017a) An ssDNA library immobilized SELEX technique for selection of an aptamer against ractopamine. *Anal Chim Acta* 961: 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.008>
- Duan N, Gong W, Wu S, Wang Z (2017b) Selection and Application of ssDNA Aptamers against Clenbuterol Hydrochloride Based on ssDNA Library Immobilized SELEX. *J Agr Food Chem* 65(8): 1771–1777. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04951>
- Dunn MR, Jimenez RM, Chaput JC (2014) Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat Rev Chem* 1(10): 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0076>
- Ellington AD, Szostak JW (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346(6287): 818–822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>
- Evtugyn G, Hianik T (2019) Aptamer-based biosensors for mycotoxin detection. *Nanomycotoxicology: Treating Mycotoxins in the Nano Way*. Elsevier Inc., pp 35–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817998-7.00003-3>
- FAO (2020) Climate change: Unpacking the burden on food safety. *Food safety and quality series*. <https://doi.org/10.4060/ca8185en>
- Foster A (2013) Development of biocompatible aptamer films as smart materials for novel fertilizer systems. *PhD Thesis*. Carleton University, 142 p
- Geiger A, Burgstaller P, Eltz H Von der, Roeder A et al (1996) RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res* 24(6): 1029–1036. <https://doi.org/10.1093/nar/24.6.1029>
- Gong P, Quan H, He C (2014) Targeting MAGO proteins with a peptide aptamer reinforces their essential roles in multiple

- rice developmental pathways. *Plant J* 80(5): 905–914. <https://doi.org/10.1111/tpj.12672>
- Goud KY, Reddy KK, Satyanarayana M, Kummari S et al (2020) A review on recent developments in optical and electrochemical aptamer-based assays for mycotoxins using advanced nanomaterials. *Microchim Acta* 187(1): 1–32. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-4034-0>
- Ha NR, Lee SC, Hyun JW, Yoon MY (2016) Development of inhibitory ssDNA aptamers for the FtsZ cell division protein from citrus canker phytopathogen. *Process Biochem* 51(1): 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.008>
- He J, Liu Y, Fan M, Liu X (2011) Isolation and identification of the DNA aptamer target to acetamiprid. *J Agr Food Chem* 59(5): 1582–1586. <https://doi.org/10.1021/jf104189g>
- Huang R, Xi Z, He N (2015) Applications of aptamers for chemistry analysis, medicine and food security. *Sci China Chem* 58(7): 1122–1130. <https://doi.org/10.1007/s11426-015-5344-7>
- Iliuk AB, Hu L, Tao WA (2011) Aptamer in Bioanalytical Applications. *Anal Chem* 83(12): 4440–4452. <https://doi.org/10.1021/ac201057w>
- Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* 263(5152): 1425–1429. <https://doi.org/10.1126/science.7510417>
- Kasoju A, Shrikrishna NS, Shahdeo D, Khan AA et al (2020) Microfluidic paper device for rapid detection of aflatoxin B1 using an aptamer based colorimetric assay. *RSC Adv* 10(20): 11843–11850. <https://doi.org/10.1039/d0ra00062k>
- Kaur H, Bruno JG, Kumar A, Sharma TK (2018) Aptamers in the therapeutics and diagnostics pipelines. *Theranostics* 8(15): 4016–4032. <https://doi.org/10.7150/thno.25958>
- Komarova N, Kuznetsov A (2019) Inside the black box: What makes Selex better? *Molecules* 24(19): 3598. <https://doi.org/10.3390/molecules24193598>
- Krivitsky V, Granot E, Avidor Y, Borberg E et al (2021) Rapid Collection and Aptamer-Based Sensitive Electrochemical Detection of Soybean Rust Fungi Airborne Urediniospores. *ACS Sens* 6(3): 1187–1198. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c02452>
- Kuznetsov A, Komarova N, Andrianova M, Grudtsov V et al (2018) Aptamer based vanillin sensor using an ion-sensitive field-effect transistor. *Microchim Acta* 185(1): 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2586-4>
- Lan L, Yao Y, Ping J, Ying Y (2017) Recent progress in nanomaterial-based optical aptamer assay for the detection of food chemical contaminants. *ACS Appl Mater Interfaces* 9(28): 23287–23301. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b03937>
- Lopez-Ochoa L, Ramirez-Prado J, Hanley-Bowdoin L (2006) Peptide Aptamers That Bind to a Geminivirus Replication Protein Interfere with Viral Replication in Plant Cells. *J Virol* 80(12): 5841–5853. <https://doi.org/10.1128/jvi.02698-05>
- Lu Q, Liu X, Hou J, Yuan Q et al (2020) Selection of Aptamers Specific for DEHP Based on ssDNA Library Immobilized SELEX and Development of Electrochemical Impedance Spectroscopy Aptasensor. *Molecules* 25(3): 747. <https://doi.org/10.3390/molecules25030747>
- Lv L, Li D, Liu R, Cui C et al (2017) Label-free aptasensor for ochratoxin A detection using SYBR Gold as a probe. *Sens Actuators B Chem* 246: 647–652. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.02.143>
- Ma X, Wang W, Chen X, Xia Y et al (2015) Selection, characterization and application of aptamers targeted to Aflatoxin B2. *Food Control* 47: 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.037>
- Ma X, Wang W, Chen X, Xia Y et al (2014) Selection, identification, and application of Aflatoxin B1 aptamer. *Eur Food Res Technol* 238(6): 919–925. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2176-1>
- Majdinasab M, Aissa S Ben, Marty JL (2021) Advances in colorimetric strategies for mycotoxins detection: Toward rapid industrial monitoring. *Toxins* 13(1): 1–35. <https://doi.org/10.3390/toxins13010013>
- Majdinasab M, Hayat A, Marty JL (2018) Aptamer-based assays and aptasensors for detection of pathogenic bacteria in food samples. *Trends in Analyt Chem* 107: 60–77. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.07.016>
- Malhotra S, Pandey AK, Rajput YS, Sharma R (2014) Selection of aptamers for aflatoxin M1 and their characterization. *J Mol Recognit* 27(8): 493–500. <https://doi.org/10.1002/jmr.2370>
- Mastronardi E (2017) Development of aptamers and aptamer-based materials for agricultural applications. *PhD Thesis*. Carleton University, 219 p
- Mastronardi E, Foster A, Zhang X, DeRosa MC (2014) Smart materials based on DNA aptamers: Taking aptasensing to the next level. *Sensors* 14(2): 3156–3171. <https://doi.org/10.3390/s140203156>
- McKeague M, Bradley CR, Girolamo A De, Visconti A (2010) Screening and Initial Binding Assessment of Fumonisin B1 Aptamers. *Int J Mol Sci* 11(12): 4864–4881. <https://doi.org/10.3390/ijms11124864>
- McKeague M, Shigdar S, Sohail M. Aptamer Companies. <http://aptamersociety.org/aptamer-companies/> (2021)
- McKeague M, Velu R, Hill K, Bardóczy V et al (2014) Selection and characterization of a novel DNA aptamer for label-free fluorescence biosensing of ochratoxin A. *Toxins* 6(8): 2435–2452. <https://doi.org/10.3390/toxins6082435>
- Mehlhorn A, Rahimi P, Joseph Y (2018) Aptamer-based biosensors for antibiotic detection: A review. *Biosensors* 8(2): 54. <https://doi.org/10.3390/bios8020054>
- Odeh F, Nsairat H, Alshaer W, Ismail MA et al (2020) Aptamers chemistry: Chemical modifications and conjugation strategies. *Molecules* 25(1): 3. <https://doi.org/10.3390/molecules25010003>
- Paniel N, Istamboulié G, Triki A, Lozano C et al (2017) Selection of DNA aptamers against penicillin G using Capture-SELEX for the development of an impedimetric sensor. *Talanta* 162: 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.058>
- Patel DJ, Suri AK (2000) Structure, recognition and discrimination in RNA aptamer complexes with cofactors, amino acids, drugs and aminoglycoside antibiotics. *Rev Mol Biotechnol* 74(1): 39–60. [https://doi.org/10.1016/s1389-0352\(99\)00003-3](https://doi.org/10.1016/s1389-0352(99)00003-3)
- Pichon V, Brothier F, Combès A (2015) Aptamer-based-sorbents for sample treatment – A review. *Anal Bioanal Chem* 407(3): 681–698. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8129-5>
- Qi Y, Ma J, Chen X, Xiu FR et al (2019) Practical aptamer-based assay of heavy metal mercury ion in contaminated environmental samples: convenience and sensitivity. *Anal Bioanal Chem* 412(2): 439–448. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02253-8>
- Rani L, Thapa K, Kanojia N, Sharma N et al (2021) An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *J Clean Prod* 283: 124657. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124657>

- Reinemann C, Frein von Fritsch U, Rudolph S, Strehlitz B (2016) Generation and characterization of quinolone-specific DNA aptamers suitable for water monitoring. *Biosens Bioelectron* 77: 1039–1047. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.069>
- Reyes MI, Nash TE, Dallas MM, Ascencio-Ibanez JT et al (2013) Peptide Aptamers That Bind to Geminivirus Replication Proteins Confer a Resistance Phenotype to Tomato Yellow Leaf Curl Virus and Tomato Mottle Virus Infection in Tomato. *J Virol* 87(17): 9691–9706. <https://doi.org/10.1128/jvi.01095-13>
- Rodriguez RS, O’Keefe TL, Froehlich C, Lewis RE et al (2021) Sensing Food Contaminants: Advances in Analytical Methods and Techniques. *Anal Chem* 93(1): 23–40. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04357>
- Romero-González R (2015) Food safety: How analytical chemists ensure it. *Anal Methods* 7(17): 7193–7201. <https://doi.org/10.1039/c5ay00263j>
- Rouah-Martin E, Mehta J, Dorst B van, Saeger S et al (2012) Aptamer-based molecular recognition of lysergamine, metergoline and small ergot alkaloids. *Int J Mol Sci* 13(12): 17138–17159. <https://doi.org/10.3390/ijms131217138>
- Rouah E, Maho W, Mehta J, Saeger S De et al (2014) Aptamer-Based Extraction of Ergot Alkaloids from Ergot Contaminated Rye Feed. *Adv Biosci Biotechnol* 5(8): 692–698. <https://doi.org/10.4236/abb.2014.58082>
- Rudolph C, Schreier PH, Uhrig JF (2003) Peptide-mediated broad-spectrum plant resistance to tospoviruses. *P Natl A Sci* 100(8): 4429–4434. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730832100>
- Sera T (2017) Use of peptide aptamers, cationic peptides and artificial zinc finger proteins to generate resistance to plant viruses. *Curr Opin Virol* 26: 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.07.023>
- Shan H, Li X, Liu L, Song D et al (2020) Recent advances in nanocomposite-based electrochemical aptasensors for the detection of toxins. *J Mater Chem B* 8(27): 5808–5825. <https://doi.org/10.1039/D0TB00705F>
- Sultan Y (2011) Development of Smart Materials Using Aptamer Based Bionanotechnologies. *PhD Thesis*. Carleton University, 206 pp
- Sun S, Zhao R, Feng S, Xie Y (2018) Colorimetric zearalenone assay based on the use of an aptamer and of gold nanoparticles with peroxidase-like activity. *Microchim Acta* 185(12). <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3078-x>
- Tittlemier SA, Brunkhorst J, Cramer B, DeRosa MC et al (2021) Developments in mycotoxin analysis: an update for 2019–2020. *World Mycotoxin J* 14(1): 3–26. <https://doi.org/10.3920/wmj2020.2664>
- Tombelli S, Minunni M, Mascini M (2007) Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis. *Biomol Eng* 24(2): 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.03.003>
- Truong PL, Duyen VTC, Toi V Van (2021) Rapid Detection of Tebuconazole Based on Aptasensor and Aggregation of Silver Nanoparticles. *J Nanomater*. <https://doi.org/10.1155/2021/5532477>
- Whalon ME, Mota-Sanchez D, Hollingworth RM (2008) Analysis of global pesticide resistance in arthropods. In: Whalon ME, Mota-Sanchez D, Hollingworth RM (eds) *Global Pesticide Resistance in Arthropods*. CAB International. 5–31. <http://dx.doi.org/10.1079/9781845933531.0005>
- Wang L, Liu X, Zhang Q, Zhang C et al (2012) Selection of DNA aptamers that bind to four organophosphorus pesticides. *Biotechnol Lett* 34(5): 869–874. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0850-6>
- Wu S, Duan N, Zhang W, Zhao S, Wang Z (2016) Screening and development of DNA aptamers as capture probes for colorimetric detection of patulin. *Anal Biochem* 508: 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.05.024>
- Wu S, Liu H, Liu Y (2012) Deoxynivalenol nucleic acid aptamer and application thereof. Invention patent CN102559686
- Wu Y, Zhan S, Wang L, Zhou P (2014) Selection of a DNA aptamer for cadmium detection based on cationic polymer mediated aggregation of gold nanoparticles. *Analyst* 139(6): 1550–1561. <https://doi.org/10.1039/c3an02117c>
- Xia X, He Q, Dong Y, Deng R et al (2020a) Aptamer-based homogeneous analysis for food control. *Curr Anal Chem* 16(1): 4–13. <https://doi.org/10.2174/1573411014666180810125737>
- Xia X, Zhang T, Deng S, Chen J et al (2020b) Visualization of Mycotoxins in Living Cells Using Conformation-Resolved Aptamer Nanoprobes. *ACS Sustain Chem Eng* 8(26): 9920–9925. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c03399>
- Xiao X, Hu S, Lai X, Peng J et al (2021) Developmental trend of immunoassays for monitoring hazards in food samples: A review. *Trends Food Sci Technol* 111: 68–88. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.045>
- Xu L, Callaway ZT, Wang R, Wang H et al (2015) A fluorescent aptasensor coupled with nanobead-based immunomagnetic separation for simultaneous detection of four foodborne pathogenic bacteria. *Trans ASABE* 58(3): 891–906. <https://doi.org/10.13031/trans.58.11089>
- Xu Q, Ye X, Ma X, Li H et al (2019) Engineering a peptide aptamer to target calmodulin for the inhibition of Magnaporthe oryzae. *Fungal Biol* 123(7): 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.04.005>
- Yadav GS, Parashar A, Aggarwal NK (2019) Aptamer: A Next Generation Tool for Application in Agricultural Industry for Food Safety. In: Yadav GS, Kumar V, Aggarwal NK (eds), *Aptamers: Biotechnological Applications of a Next Generation Tool*. Springer Singapore, Singapore, pp 175–186. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8836-1_12
- Yang C, Bie J, Zhang X, Yan C et al (2018) A label-free aptasensor for the detection of tetracycline based on the luminescence of SYBR Green I. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 202: 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.05.075>
- Yang C, Wang Y, Marty JL, Yang X (2011) Aptamer-based colorimetric biosensing of Ochratoxin A using unmodified gold nanoparticles indicator. *Biosens Bioelectron* 26(5): 2724–2727. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.032>
- Ye H, Duan N, Wu S, Tan G et al (2017) Orientation selection of broad-spectrum aptamers against lipopolysaccharides based on capture-SELEX by using magnetic nanoparticles. *Microchim Acta* 184(11): 4235–4242. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2453-3>
- Yi H, Yan Z, Wang L, Zhou X et al (2019) Fluorometric determination of ofloxacin by using an aptamer and SYBR Green I. *Microchim Acta* 186(10): 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3788-8>
- Yin X, Wang S, Liu X, He C et al (2017) Aptamer-based colorimetric biosensing of ochratoxin A in fortified white grape wine sample using unmodified gold nanoparticles. *Anal Sci* 33(6): 659–664. <https://doi.org/10.2116/analsci.33.659>
- Yue F, Li F, Kong Q, Guo Y et al (2021) Recent advances in aptamer-based sensors for aminoglycoside antibiotics

- detection and their applications. *Sci Total Environ* 762: 143129. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143129>
- Zhang G, Zhu C, Huang Y, Yan J et al (2018) A lateral flow strip based aptasensor for detection of Ochratoxin A in corn samples. *Molecules* 23(2): 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules23020291>
- Zhang, K, Li H, Wang W, Cao J et al (2020) Application of multiplexed aptasensors in food contaminants detection. *ACS Sens* 5(12): 3721–3738. <https://doi.org/10.3390/molecules23020291>

Plant Protection News, 2022, 105(1), p. 6–27

OECD+WoS: 4.01+AM (Agronomy)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-1-15186>

Full-text review

PROSPECTS FOR THE APPLICATION OF APTAMERS IN PLANT PROTECTION AND CROP PRODUCTION

A.A. Kovalenko^{1,2}, V.V. Sharoiko³, I.A. Kazartsev^{1*}

¹All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

²Infochemistry Scientific Center, ITMO University, St. Petersburg, Russia

³Pavlov First State Medical University of St. Petersburg, St. Petersburg, Russia

*corresponding author, e-mail: kazartsev@inbox.ru

In modern agriculture, there is a demand for alternative approaches to increase yields, to upgrade methods for detecting chemical contaminants, and to improve quality of phytosanitary diagnostics and the effectiveness of plant protection. One promising approach to addressing these issues is aptamer technology. Aptamers are oligonucleotide and peptide molecules capable of molecular recognition of both small inorganic and organic compounds, as well as proteins. Development of aptamers specific to the target molecule is performed *in vitro* using SELEX technology. Aptamer binding to the target follows principles common to antigen-antibody interaction. Due to this property, aptamers have found applications as targeted biological agents, «smart» materials, and new generation bioanalytical sensors. This review contains a brief analysis of the successes and prospects of applying aptamer technology in analytical monitoring and phytosanitary control. In particular, approaches and examples of aptamer-based test systems and sensors for detection of various compounds in natural objects, and related commercial products are discussed. Examples of aptamers application in development of “smart” fertilizers, innovative pesticides, and for engineering of plants resistant to viral diseases are also given.

Keywords: aptamers, oligonucleotides, peptides, food safety, plant protection, biosensors, nanofertilizers, pesticides

Submitted: 24.12.2021

Accepted: 28.02.2022

МЕТОД РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ ОТ НАСЕКОМЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ

В.С. Журавлев*, В.В. Долгих, С.А. Тимофеев, Ф.Б. Ганнибал

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

* ответственный за переписку, e-mail: v.guravlev@hotmail.com

РНК-интерференция, или подавление экспрессии генов малыми РНК, описанное у нематоды *Caenorhabditis elegans* в 1998 году, в настоящее время находит широкое практическое применение, в том числе и в области защиты растений. Использование молекул двуцепочечной РНК в качестве индуктора пути РНК-интерференции у насекомых-вредителей позволяет рассматривать их как основу для создания современных пестицидов. В данном обзоре приводятся данные об особенностях механизма искусственно-индуцированной РНК-интерференции и существующих стратегиях доставки малых РНК в организм насекомого для защиты растений. Главные достоинства данного подхода заключаются в специфичности действия и использовании естественного механизма, лежащего в основе противовирусной защиты клетки. Среди основных недостатков следует указать невосприимчивость отдельных видов вредителей к механизму и быструю деградацию малых РНК. Для прогресса в этой области необходимы дальнейшие глубокие исследования, однако уже сейчас понятно, что в скором времени пестициды на основе малых РНК существенно обогатят арсенал средств и способов защиты растений.

Ключевые слова: малые РНК, РНК-пестициды, сайленсинг гена, молекулярная защита растений

Поступила в редакцию: 23.01.2022

Принята к печати: 31.03.2022

Введение

РНК-интерференция (англ. *RNA interference*, РНКи) – консервативный механизм регуляции экспрессии генов посредством деградации мРНК, а также ряда других эффектов, например репрессии трансляции или ремоделирования хроматина, обнаруженный у всех эукариотических организмов (Fire et al., 1998; Zotti et al., 2018; Goulin et al., 2019). Хотя сам механизм РНК-интерференции открыт в 1998 году при исследовании малых РНК у нематоды *Caenorhabditis elegans*, к тому моменту уже был накоплен ряд данных о подавлении активности генов под действием антисмысловых РНК у растений и грибов (Napoli et al., 1990; Fire et al., 1991; Romano et al., 1992). В настоящее время РНКи считается эволюционно древним механизмом защиты организма от вирусов и мобильных генетических элементов, который превратился в механизм внутренней регуляции активности генов (Matzke, Birchler, 2005; Shabalina, Koonin, 2008; Gutbrod, Martienssen, 2020). Например, в организме человека РНК-интерференция отвечает за контроль таких жизненно важных процессов как рост и пролиферация клеток, дифференцировка тканей, а также образование гетерохроматина. Дисфункция данной системы приводит к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, неврологических расстройств и различных типов рака (Макарова, Крамеров, 2007; Lu et al., 2008). У растений и беспозвоночных животных РНК-интерференция остается ключевым элементом противовирусной защиты организма (Макарова, Крамеров, 2007). С момента своего открытия РНКи стала также удобным инструментом для выяснения функций генов, поскольку механизм позволяет надежно подавлять экспрессию гена-интереса и определить его роль. С точки зрения сельского хозяйства, РНКи, используемая для блокирования экспрессии генов-мишеней различных вредителей и патогенов, имеет большой потенциал в защите растений, сравнимый с другими перспективными стратегиями контроля, например,

использованием нейротоксичных инсектицидов. Ожидается, что, в ближайшем будущем, на рынке пестицидов будут представлены следующие категории препаратов на основе РНКи: агенты прямого контроля, ингибиторы факторов резистентности, регуляторы роста насекомых и стимуляторы роста (имитаторы активности фитогормонов) (Taning et al., 2020). Преимуществами препаратов нового типа станет: 1) высокая специфичность за счет нацеливания на конкретный ген конкретного вредителя или близкородственной группы фитофагов, что позволит избежать нецелевых эффектов у остальных участников агробиоценозов (Liu et al., 2020); 2) отсутствие токсичности для человека и объектов окружающей среды благодаря тому, что РНК выступает естественным компонентом живого в широком смысле этого слова и легко подвергается деградации как в пищеварительной системе, так в воде и почве (Dubelman et al., 2014; Albright et al., 2017; De Shutter et al., 2022). Однако данное преимущество служит, несомненно, и слабым местом РНКи как способа защиты растений, поскольку время жизни малых РНК, используемых как химический пестицид, крайне невелико. Способность сохранять устойчивость к действию факторов внешней среды или ферментативной деградации с обеспечением безопасности всех участников агробиоценозов должна быть неразрывно связана с гарантированием эффективности действия будущих препаратов на основе РНК.

В обобщенном виде механизм РНК-интерференции включает в себя две основные составляющие – нуклеазы и направляющую РНК (англ. *guide strand*), которая, как правило, образуется из двуцепочечного предшественника длиной 18–22 п.н. (дцРНК, или РНК-дуплекс) одного из двух типов малых РНК – короткой интерферирующей РНК (англ. *siRNA – small interference RNA, siRNA*, киРНК) или микроРНК (англ. *microRNA, miRNA*, миРНК). Оба типа малых РНК имеют схожие механизмы действия в клетке,

отличаются своим происхождением, вторичной структурой и функцией, но каждая из них способна запустить классический путь РНКи в любое время в зависимости от потребностей организма. Будучи эволюционно более поздними, представленными исключительно у Archaeplastida и Unikonta с резким увеличением репертуара генов у двусторонне-симметричных животных со сложным планом строения тела, миРНК регулируют паттерн экспрессии генов собственного организма, в то время как киРНК участвуют в защите организма от чужеродных нуклеиновых кислот и распространены во всех пяти супергруппах эукариот со снижением своей защитной функции у высших позвоночных (Shabalina, Koonin, 2008; Carthew, Sontheimer, 2009; Huntzinger, Izaurralde, 2011; Zotti et al., 2018). В 2006 году сразу у нескольких млекопитающих, включая человека, был открыт третий тип РНК, способный осуществлять подавление (сайленсинг, англ. *silencing*) активности генов и описанный, пока что, только у животных – пиРНК (англ. *piwi-interacting RNA, piRNA, piwiRNA*). Данный тип малых РНК и соответствующий ему регуляторный путь имеют ряд отличительных особенностей, таких как одноцепочечная структура молекулы, взаимодействие с белками подсемейства Piwi, цикл образования вторичных пиРНК, или цикл «пинг-понг», а также особая роль в раннем развитии организма, сперматогенезе и защите генома от мобильных элементов (Макарова, Крамеров, 2007). Количество обнаруженных пиРНК у млекопитающих превышает количество других малых РНК и регулируется белками подсемейства PIWI (у *Drosophila melanogaster* – Ago3, Aub и Piwi) – близкими «родственниками» белков Argonaute, образующее вместе единое консервативное семейство. Роль белков PIWI насекомых заключается в поддержании фертильности и развитии гамет, при этом их экспрессия не ограничивается только клетками зародышевой линии (Макарова, Крамеров, 2007). Несмотря на то, что, фактически, РНК-интерференция может быть запущена тремя типами малых РНК, для прикладного использования и научных исследований используется лишь киРНК. Во-первых, киРНК единственная может иметь экзогенное происхождение и доставляться в клетку из окружающей ее среды. Во-вторых, ее основной механизм действия заключается в деградации комплементарной молекулы мРНК, что позволяет надежно подавлять экспрессию целевого гена

(Cooper et al., 2019; Zhu et al., 2020). К настоящему моменту уже достигнуты успехи в разработке РНК-пестицидов различными исследовательскими группами как на базе университетов, так и отделами R&D крупнейших биотехнологических компаний. Сразу несколько продуктов на основе РНКи находятся на стадиях активной коммерциализации и проходят процедуру регистрации у государственных регуляторов. Наибольших успехов достигли компании Bayer и GreenLight Biosciences, работающие сразу над несколькими пестицидами. Последняя в конце прошлого года представила успешный отчет о разработке препарата Ledprona, направленный на борьбу с колорадским жуком, который сейчас находится на стадии регистрации (Rodrigues et al., 2021). Компания Bayer уже в настоящем году планирует коммерческое внедрение трансгенной технологии SmartStax Pro на территории США (SmartStax® PRO Technology ...). По мимо этого, обе компании разрабатывают продукты, предназначенные для борьбы с паразитом медоносных пчел — клещем *Varroa* sp. GreenLight анонсирует регистрацию своего продукта на I квартал этого года, в то время как Bayer, по состоянию на 2019 год, заявила об ограниченном успехе своей разработки (GreenLight Biosciences...; Gene-Silencing...). Неизвестен статус проектов компаний BASF, RNAiSSANCEAg и Syngeta, разрабатывающие продукты для местного применения для борьбы с возбудителем фузариоза, капустной молью и колорадским жуком (Gene-Silencing...). Израильская компания Viaqua Therapeutics, занимающаяся изучением заболеваний различных аквакультур, разрабатывает свой первый продукт, предназначенный для борьбы с вирусом синдрома белых пятен, поражающим креветок. Представители компании заявляют, что смогли преодолеть проблемы, связанные с нестабильностью РНК в водной среде и деградацией в пищеварительной системе, и в ближайшее время планирует запуск производства пищевой добавки на основе РНК (Gene-Silencing..., Ufaz et al., 2018).

Данный обзор обобщает опыт использования РНК-интерференции в защите растений от насекомых-вредителей, представляет последние данные о механизме РНК-интерференции и современных способах доставки дцРНК в организм насекомых.

Механизм РНК-интерференции

Ни один из трех типов РНК, запускающих РНКи, сам по себе не способен к деградации комплементарной ему матричной РНК и, по сути, представляет собой лишь компонент, направляющий белковый комплекс. Все малые РНК работают в составе рибонуклеопротеинового комплекса, названного РНК-индуцированным комплексом сайленсинга гена, или RISC (англ. *RNA-induced silencing complex*) (Kobayashi, Tomari, 2016; Zhu, Palli, 2020). Минимальный комплекс, способный к деградации мРНК, включает в себя белок семейства Argonaute, роль которого заключается в связывании малой РНК и расположении ее в конформации, облегчающей распознавание мРНК и собственно молекулу РНК. Белки Argonaute могут осуществлять подавление экспрессии либо за счет собственной эндорибонуклеазной активности (например, белок Ago2 у *D. melanogaster* и млекопитающих), либо за счет привлечения

дополнительных белковых факторов, которые опосредуют репрессию трансляции, деаденилирование и/или распад мРНК (например, белки Ago1, Ago3, и Ago4 у млекопитающих) (Meister et al., 2004; Liu et al., 2004; Ameres, Zamore, 2013). Сборке RISC-комплекса в цитоплазме предшествует этап образования РНК-дуплексов при помощи белков Dicer (Dcr у *D. melanogaster*) и дцРНК-связывающих белков, который одинаков по своему механизму, но отличается у насекомых составом белков-участников для киРНК (Dcr-2 и R2D2) и миРНК (Dcr-1 и Loq) (Provost et al., 2002; Lee et al., 2004; Pham et al., 2004; Saito et al., 2005). Белок Dicer относится к семейству эндорибонуклеаз III и обладает высокой специфичностью к длинным двуцепочечным молекулам РНК, которые расщепляет на множество коротких фрагментов длиной 18–22 п.н. с двумя неспаренными нуклеотидами на 3'-концах дуплекса. Комплекс дуплекса

малой РНК с белком Argonaute, иногда, называют pre-RISC (Kobayashi, Tomari, 2016; Song, Rossi, 2017).

Помимо образования коротких РНК-дуплексов, у насекомых белок Dicer выполняет еще несколько важных функций, в частности, облегчает связывание РНК-дуплекса с белком Argonaute и помогает определить, какая из двух цепей дуплекса останется в качестве направляющей цепи, а какая станет сопутствующей (англ. *passenger strand*) и подвергнется элиминации (Kobayashi, Tomari, 2016). Для загрузки РНК-дуплекса на белок Argonaute у животных и растений требуется энергия гидролиза АТФ, который обеспечивается целым рядом белков шаперонов и ко-шаперонов, образующих комплекс Hsc70/Hsp90. В частности, для белка Ago2 *D. melanogaster* данный комплекс включает шапероны Hsc 70-4 и Hsp83 (гомолог Hsp90), а также ко-шапероны Hop, Droj2 и p23 (Khvorova et al., 2003; Iwasaki et al., 2011; Iwasaki et al., 2015). Считается, что Hsc70/Hsp90 изменяют конформацию белка Argonaute и снижают энергию активации для связывания с дцРНК за счет гидролиза АТФ до тех пор, пока белок не встретится с молекулой дцРНК. В ходе дальнейшего созревания RISC в котором происходит определение направляющей и сопутствующей цепей РНК с элиминацией из рибонуклеинового комплекса последней происходит и стабилизация всего комплекса, соответствующая наименьшей энергии энергетической кривой (Schirle, MacRae, 2012; Kobayashi, Tomari, 2016;). Таким образом, для сборки RISC и загрузки дуплекса киРНК на белок Ago2 *D. melanogaster* требуется дополнительно комплекс Hsc70/Hsp90 и комплекс Dcr2/R2D2. Комплекс шаперонов обеспечивает связывание Dcr2/R2D2/киРНК с белком Ago2 и увеличивает его время пребывания в связанном состоянии для полноценной загрузки РНК-дуплекса. Основным фактором, определяющим выбор направляющей цепи, служит относительная термодинамическая стабильность двух концов дуплекса; цепь, несущая термодинамически менее стабильную пару оснований на своем 5'-конце, в дальнейшем действует как направляющая цепь. При сборке Ago2-RISC мух *D. melanogaster* термодинамическая асимметрия сначала распознается RISC-загрузочным комплексом (англ. *RISC-loading complex (RLC)*), состоящим из белка Dcr-2 и дцРНК-связывающего белка R2D2. R2D2 связывается с более стабильным концом дуплексов, в то время как Dcr-2 остается на менее стабильном конце, определяя полярность дуплексов малых РНК. Помимо своей роли в выборе направляющей цепи, RLC важен для связывания дуплекса РНК и Ago2 у насекомых, но не у млекопитающих (Liu et al., 2003; Liu et al., 2006; Tomari, Zamore, 2007; Kobayashi, Tomari, 2016).

Полное созревание RISC включает этапы расклинивания РНК-дуплекса и элиминацию сопутствующей цепи. На этапе расклинивания первостепенное значение имеет N-домен белка Argonaute, поскольку именно эта часть белковой молекулы как бы вклинивается между цепями РНК-дуплекса и «отцепляет» несколько пар оснований на 3'-конце направляющей цепи (Kobayashi, Tomari, 2016). Созревание завершается элиминацией сопутствующей цепи из белка Argonaute, либо путем разрезания сопутствующей цепи за счет собственной рибонуклеазной активности (характерно для киРНК), либо за счет медленного

разделения двух цепей (характерно для миРНК), в котором большую роль играет так называемый PAZ-домен белка Ago. Данный домен фиксирует 3'-конец направляющей цепи после расклинивания, что способствует дальнейшему разделению двух цепей (Matranga et al., 2005; Rand et al., 2005). Кроме того, ряд малых РНК насекомых (киРНК) и растений (киРНК и миРНК) подвергаются 2'-О-метилированию 3'-конца только направляющей или обеих цепей дуплекса с помощью метилтрансферазы Hen1. Считается, что метилирование стабилизирует и защищает малые РНК от преждевременной деградации (Horwich et al., 2007; Ameres et al., 2011).

Канонический путь РНК-интерференции с участием экзогенной киРНК (рис. 1) заканчивается направлением RISC-киРНК к комплементарной мРНК-мишени, которая деградирует. Деградацию мРНК опосредует как собственная эндонуклеазная активность PIWI-домена белка Ago2 – внесение точного «разрыва» между основаниями мРНК комплементарными 10 и 11 нуклеотиду (с 5'-конца) киРНК, так и внешние клеточные экзонуклеазы, которые заканчивают процесс деградации образовавшихся фрагментов. При неполной комплементарности своей мишени киРНК может инициировать образование гетерохроматина в соответствующем гену локусе хромосомы или осуществить репрессию трансляции (транскрипционный и постраскрипционный сайленсинг гена соответственно) (Tomari, Zamore, 2005; Orban, Izaurralde, 2005). В данном обзоре не рассматривается детально микро-РНК зависимый сайленсинг, но следует упомянуть, что в отличие от киРНК, основным механизмом подавления считается репрессия трансляции, которая может быть дополнена деградацией мРНК в случае полной комплементарности (Brodersen et al., 2008; Carthew, Sontheimer, 2009). Показано, что белки Ago часто связаны с внутриклеточными мембранами ЭПР и аппарата Гольджи, что предполагает наличие определенных субклеточных компартментов, необходимых для эффективного сайленсинга. Возможно, эти компартменты включают в себя Р-тельца, которые накапливают неактивные мРНК, а также различные нуклеазы (Cikaluk et al., 1999; Pillai et al., 2005).

Вопрос о поглощении дцРНК клетками кишечника и распространении по всему организму до сих пор остаётся открытым и нет единого мнения о том, какие именно механизмы обуславливают данный процесс у различных групп насекомых. В настоящее время предполагается участие пассивного транспорта посредством Sid-like белков (SIL), клатрин-зависимого эндоцитоза и макропиноцитоза. В системном распространении ответа РНКи могут быть задействованы структуры подобные нанотрубкам (у *D. melanogaster*), везикулярный транспорт с участием гемоцитов и белки SIL. Защита дцРНК в полостях тела и гемолимфе может быть обусловлена различной активностью дцРНКаз, которая отличается у разных видов и может иметь тканеспецифичный характер, различным уровнем рН, определяющий как стабильность самих молекул, так и активность ферментов. Есть мнение, что белки липофорины, могут связывать дцРНК и защищать их от преждевременной деградации (Cooper et al., 2019; Zhu et al., 2020).

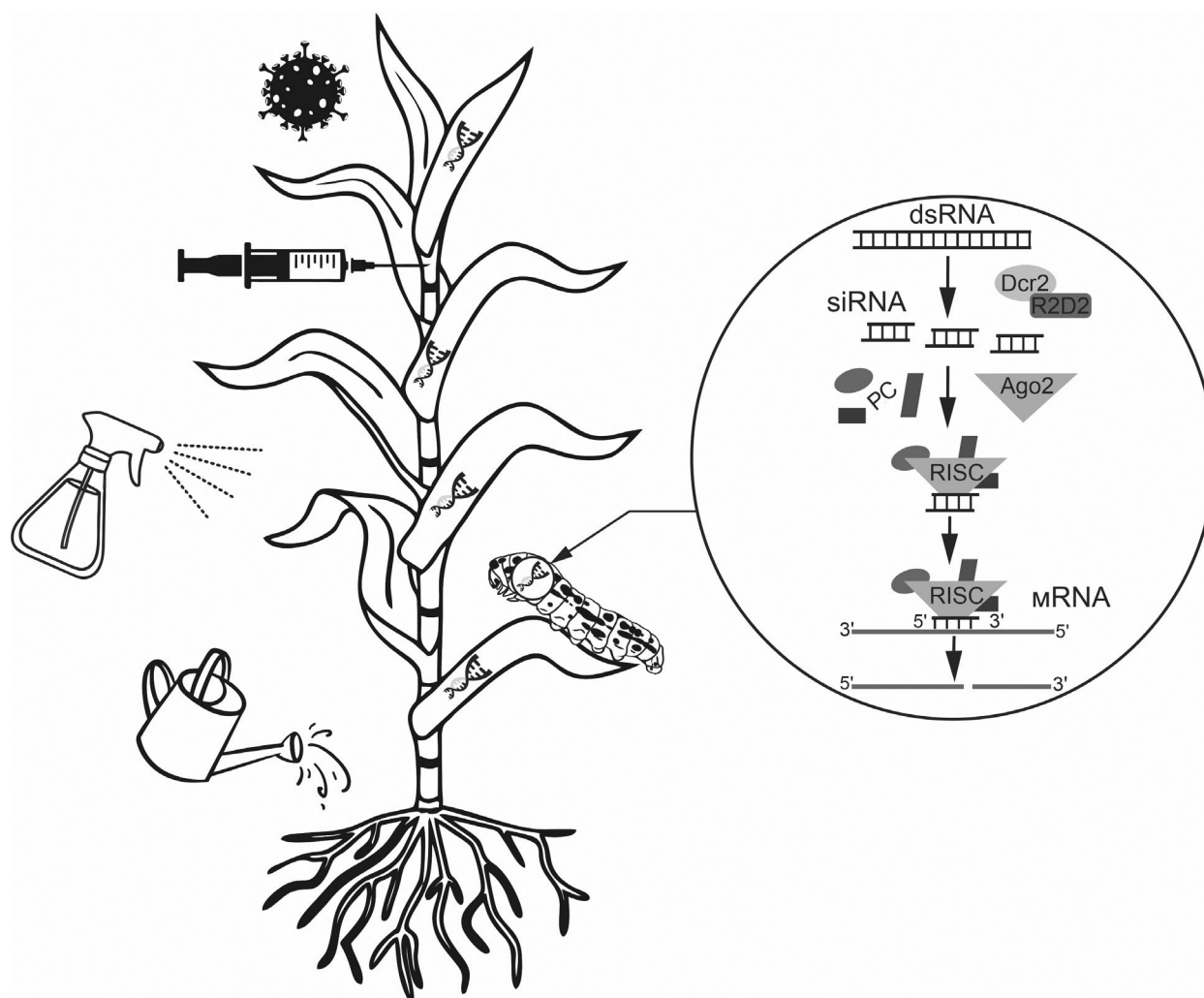


Рисунок 1. Нетрансгенные методы доставки РНК-пестицидов (см. далее) в организм насекомых-вредителей (слева) и механизм РНК-интерференции (справа), индуцированный экзогенной двуцепочечной РНК (dsRNA). Проглоченная дцРНК достигает клеток эпителия кишечника насекомого, где процессируется до короткой интерферирующей РНК (siRNA), которые связываются с белком Ago2 и рядом вспомогательных белков (PC) с образованием комплекса RISC (индуцированный РНК комплекс сайленсинга), который распознает комплементарную к РНК мРНК-мишень (mRNA) и вызывает ее деградацию

Figure 1. Non-transformative delivery methods of RNA pesticides (see below) to insect pests (left) and the RNA interference mechanism (right) induced by exogenous dsRNA. Ingested dsRNA reaches the insect intestinal epithelial cells, where it is processed to siRNAs, which bind to Ago2 and several accessory protein components (PC) to form a RISC that recognizes the complementary siRNA of the target mRNA and causes its degradation

РНК-интерференция в защите растений. Методы доставки дцРНК

РНК-интерференция находит все большее применение в области защиты растений как от патогенов, так и от вредителей (Andrade, Hunter, 2016; Zotti et al., 2018). дцРНК служит ключевым элементом всего механизма и закономерно возникают вопросы о путях производства действующего вещества и создании форм препаратов, позволяющих им достигнуть места действия. В настоящее время источником дцРНК может быть либо само растение, вырабатывающее дцРНК (HIGS, или трансгенный подход), либо *in vitro* или *in vivo* полученная дцРНК напрямую доставляется до вредителя в ходе его питания на растении или через его покровы (SIGS, или нетрансгенный подход). Последняя стратегия отличается разнообразием форм и включает микроинъекции, опыление и полив культур, замачивание корней, обработку семян и введение дцРНК в ствол, которые могут быть модифицированы дополнительным использованием липосом, наночастиц, бактерий

и вирусов для облегчения доставки и сохранения стабильности дцРНК в окружающей среде или в пищеварительном тракте насекомых (Zhu, Palli, 2020; Liu et al., 2020). Стоит заметить, что не все из перечисленных методов подходят для использования в поле (микроинъекции, замачивание), но хорошо себя зарекомендовали для проведения биотестов по защите растений в лабораторных условиях (Turner et al., 2007; Andrade, Hunter, 2016; Andrade, Hunter 2017).

Трансгенный подход, или сайленсинг гена, индуцируемый растением-хозяином (HIGS)

Несмотря на неприятие ГМО обществом и пристальное внимание к технологии со стороны контролирующих органов, использование трансгенных растений, в настоящее время, единственный пример успешного применения защиты растений от насекомых-вредителей при помощи

РНКи в полевых условиях, который доступен для применения и представлен в некоторых странах (Bolognesi et al., 2012; Head et al., 2017; SmartStax® PRO Technology...). Стратегия HIGS (англ. *Host-induced gene silencing*) подразумевает использование трансгенных культур, которые самостоятельно продуцируют дцРНК, которая (-ые) комплементарны транскриптам ключевых генов в организме вредителя. Подход реализован в отношении различных вирусных патогенов и некоторых насекомых. Насекомое, питаясь на растении, поглощает и дцРНК, которые, проходя через просвет кишечника, поступают в клетки кишечного эпителия и далее в гемолимфу. Распространяясь с гемолимфой и проникая через клеточные мембраны клеток тканей, которые она омывает, дцРНК запускают системный ответ и подавляют экспрессию гена в различных органах и тканях (Nowara et al., 2010; Baulcombe, 2015; Liu et al., 2020).

Компания Bayer последнее десятилетие занимается разработкой технологии с использованием РНК-интерференции. Первым успешным продуктом стал SmartStax® PRO, представляющим собой сорт ГМ-кукурузы, несущей ряд генов эндотоксинов и ген *DvSnf7*, кодирующий дцРНК к гену *snf7* западного кукурузного жука (*Diabrotica virgifera*). *SNF7* (белок неферментирующий сахарозу 7) это ключевой белок эндосомного сортировочного комплекса ESCRT III, который принимает участие в регуляции процесса клеточного деления, транспорте, сортировке и лизосомной деградации клеточных белков. Аномальный процесс деления клеток и нарушение деградации белков приводит к апоптозу и гибели насекомого. Технология с использованием *DvSnf7* снижает появление *D. virgifera* примерно на 80–95 % и значительно уменьшает повреждение корней. Отсутствие перекрестной резистентности между *DvSnf7* и δ -эндотоксином *Cry3Bb1*, входящий в этот же продукт, позволяет успешно использовать данную культуру в популяциях *D. virgifera*, проявляющих устойчивость к *Cry3Bb1*. В 2021 году технология получила сертификат безопасности для импорта и использования пищевых продуктов министерства сельского хозяйства КНР, что позволяет запустить применение технологии в 2022 году в США, а в 2023 – в Канаде. В планах компании расширение технологии на культуры хлопка и сои (Bolognesi et al., 2012; Head et al., 2017; SmartStax® PRO Technology...). Другой многообещающий стартап, также реализуемый в США, – RNAiSSANCE Ag LLC, запущенный компанией TechAccel. Основная цель проекта – разработка распыляемых РНК-пестицидов на базе патентованной платформы для сельского хозяйства и ветеринарии. В планах компании – снижение стоимости производства дцРНК до 1–2 долларов США за грамм (RNAi pesticides target...). Компания предлагает использование и трансгенного подхода, например, для защиты культуры табака от ряда чешуекрылых вредителей (Taning et al., 2020; TechAccel...).

К настоящему моменту большая часть примеров использования HIGS стратегии в защите растений находится на стадии исследований или ранних полевых испытаний. Abdellatef с соавторами успешно показали, что подавление гена *shp* у зерновой тли *Sitobion avenae*, питающейся на линии трансгенного ячменя, экспрессирующего двуцепочечную РНК приводит к значительному снижению уровня экспрессии гена, которое сохраняется и передается

потомству на протяжении 7 поколений. Данный ген кодирует белок SHP, который участвует в затвердевании гелеобразной слюны и формировании слюной оболочки, которая обеспечивает непрерывность и безопасность питания насекомого. Кормление насекомых на нескольких линиях трансгенного ячменя на протяжении 2 недель вызвало уменьшение размеров слюной оболочки на 81 %, что, как и предполагалось, оказало влияние на эффективность питания и репродуктивную систему насекомого. В ходе эксперимента наблюдалась задержка развития и снижалась выживаемость взрослых тлей (Abdellatef et al., 2015). Трансгенные линии табака, экспрессирующие дцРНК для подавления экспрессии гена *v-ATФазы А* табачной белокрылки (*Bemisia tabaci*), смогли снизить уровень соответствующих транскриптов в организме вредителя и привести к его гибели после питания на трансгенных растениях. Вакуолярная АТФаза представляет собой протонный насос, расположенный в мембранах различных клеточных компартментов, и широко распространена у эукариот, отвечая за многие жизненно важные функции, в том числе регуляцию биохимических процессов в клетке – создание кислого рН и обеспечения работы гидролитических ферментов, деградация белков, вторичный транспорт и др. Этот фермент может выступить одной из неспецифических мишеней, которая позволит воздействовать на различные группы насекомых (Кирпичникова и др., 2016; Thakur et al., 2014). Испытания трансгенных линий хлопчатника, подавляющих экспрессию гена спиртообразующей ацил-КоА редуктазы клопа *Adephocoris suturalis*, продемонстрировали сокращение популяции вредителя совместно с развитием устойчивости растений к наносимым повреждениям (Luo et al., 2017).

Растения, как упоминалось ранее, также обладают собственным механизмом РНКи, который способен процессировать трансгенные длинные РНК-дуплексы до кнРНК длиной около 21 п.н.. При этом для запуска эффективной РНКи длина экзогенной дцРНК, поглощенная клеткой насекомого, должна составлять не менее 60 п.н.. Таким образом, процессирование дцРНК самим растением способно ограничивать эффективность HIGS подхода в борьбе с насекомыми-вредителями, не позволяя дцРНК накапливаться в растительной ткани в достаточном количестве. Коллеги из института Макса Планка преодолели данную проблему используя трансплантомные линии картофеля. Трансформация хлоропластов, имеющих прокариотическое происхождение и не обладающих функциональным аппаратом РНКи, позволила сохранить дцРНК от процессирования растительной нуклеазой *Dicer* и сравнить эффективность трансгенных и трансплантомных линий картофеля в подавлении экспрессии генов *b*-актина и белка *Snf7* колорадского жука. Питание личинок первого возраста в течение 9 дней показало, что наибольшей инсектицидной активностью обладали именно трансплантомные растения, экспрессирующие дцРНК к *b*-актину, и которые вызывали 100 % гибель насекомых уже на 5 день. Ни одно из трансгенных растений картофеля не вызывало гибели личинок, но замедляло их рост. Авторы сделали вывод, что короткие малые РНК, скармливаемые насекомым, имеют незначительный или вовсе отсутствующий сайленс-эффект (Zhang J et al., 2015).

Нетрансгенные стратегии, или спрей-индуцированный сайленсинг гена (SIGS)

Альтернативой трансформационной стратегии и использованию ГМ-растений служит спрей-индуцированный сайленсинг гена, или SIGS (англ. *spray-induced gene silencing*), в котором дцРНК, полученная химическим синтезом или биотехнологическим путем, используется в качестве прямого (опрыскивание растений, протравливание семян) или косвенного (орошение, замачивание корней) агента контроля. Несмотря на то, что локальное нанесение малых и двуцепочечных РНК на поверхность растений применяли и ранее, устоявшееся название подход получил лишь недавно. В 2016 году Koch с соавторами использовали некодирующую дцРНК комплементарную транскриптам трех ланостерол С-14 α -деметираз фитопатогенного гриба *Fusarium graminearum* и показали, что спрей-индуцированный сайленсинг не только эффективен при локальном нанесении дцРНК, но оказывает и системное действие в необработанных частях растения. (Koch et al., 2016). Наблюдая снижение стоимости производства дцРНК и многообещающие результаты многочисленных исследований стабильности и эффективности действия антисмысловых РНК, можно предположить, что именно эта стратегия применения РНК-интерференции в защите растений будет развиваться в будущем наиболее интенсивно (Zotti et al., 2018; Taning et al., 2020). Поскольку подход не предполагает внесения наследуемых изменений в геном, можно также ожидать, что коммерческие продукты на его основе не будут подвергаться столь длительным процедурам тестирования и одобрения как ГМ-культуры (Cagliari et al., 2019).

Обработка листьев

Использование распыления и локального нанесения – один из наиболее популярных методов доставки малых РНК в рамках SIGS-стратегии. На сегодня проведены исследования среди различных групп вредителей, включая сосущих насекомых и клещей. Одни из первых работ, которые показали, что успешный нокдаун целевого гена путем пероральной доставки дцРНК возможен, были проведены на триатомовом клопе *Rhodnius prolixus* и бабочке *Epiphys postvittana*, интродуцированной из Австралии. Особенность данных исследований заключается в анализе подавления генов на уровне транскриптов и акцент на функциональную генетику, а не на прикладное применение (Araujo et al., 2006; Turner et al., 2006).

Для исследований же последних лет в области РНК-пестицидов характерен фокус на биологических тестах, вопросах системности распространения РНК-молекул, разнообразии вредителей и их способности поглощать малые РНК и отвечать на них, установлении зависимости «доза-эффект». В одной из последних работ, посвященной борьбе с колорадским жуком, использовались личики II возраста для оценки эффективной концентрации дцРНК и транскрипты гена актина в качестве целевой мишени. Кормление личинок листьями картофеля с нанесенной дцРНК в количестве 5 мкг на лист вызвало эффективное ингибирование роста и последующую гибель личинок, которая достигала 96%. Помимо этого, авторы, используя дцРНК различной длины смогли показать, что биологическая активность актин-дцРНК обратно пропорциональна ее длине – наибольшая смертность наблюдалась

у личинок, которые питались дцРНК размером около 250–300 п.н. ДцРНК размером 50–100 п.н. не приводили к гибели насекомых. Стабильность дцРНК под воздействием внешних условий – крайне важная характеристика будущего РНК-пестицида, позволяющая перейти к масштабированию производства и полевым испытаниям. В ходе данной работы было установлено, что нанесенная дцРНК не смывается с листьев и в значительных количествах сохраняется на протяжении четырех недель. В случае интенсивного воздействия ультрафиолетового излучения актин-дцРНК теряла свою биологическую активность через 30 минут, что накладывает ограничения на применение в поле, но оставляет возможность применения в условиях защищенного грунта (Miguel, Scott, 2016).

Стабильность молекул и доставка РНК до вредителя может стать краеугольным камнем в вопросе эффективности РНК-интерференции. Существующие в настоящее время решения включают использование неорганических наночастиц и липосом. Связывание молекул РНК с внешней или внутренней поверхностью наночастиц позволяет защитить дцРНК от пагубного воздействия как внешней, так и внутренней среды и способствует успешному поглощению насекомыми. Zhang с коллегами показали возможность подавления экспрессии генов хитозан синтазы и семафорина-1 (сигнального белка, регулирующего процесс формирования аксонов, регуляции иммунитета и ангиогенеза) у комаров *Anopheles gambiae* и *A. aegypti* соответственно в комплексе дцРНК-хитозан. (Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2015; Battistini, Tamagnone, 2016). Известно, что эффективность РНК-интерференции варьирует у различных отрядов насекомых. Менее чувствительны к экзогенной дцРНК чешуекрылые и прямокрылые благодаря наличию у них дцРНК рибонуклеаз или низкому уровню экспрессии генов пути РНК-интерференции, что обуславливает неэффективность преобразования уже захваченных клеткой молекул (Yoon et al., 2017). Флюоресцентные наночастицы в комплексе с дцРНК способны вызывать уменьшение размера и гибель личинок азиатского кукурузного мотылька *Ostrinia furnacalis* при кормлении обработанными листьями (He et al., 2013). Многообещающий результат был продемонстрирован Zheng совместно с коллегами в снижении плотности популяции зеленой тли (*Aphis glycines*) путем трансдермальной доставки дцРНК, в составе наночастиц и детергента. Разработанный авторами состав эффективно преодолевал наружные покровы и проникал в гемоцель, где распределялся по различным тканям в течение 1 часа. Гемоцитин-дцРНК мощно подавляла экспрессию целевого гена (95.4%) при сокращении плотности популяции тли на 80% (Zheng et al., 2019).

Преодоление наружных покровов насекомых возможно и с использованием липосом. Так в недавней работе было показано, что дцРНК к гену рибосомального белка Р0, заключенная в липосомальную оболочку может выступать в качестве потенциального противоклещевого агента – инкубация клещей *Rhipicephalus haemaphysaloides* привела к снижению скорости линьки, нарушению кормления и размножения (Zhang et al, 2018). Широкое применение в полевых условиях может найти совместная разработка Квинслендского альянса сельскохозяйственных и пищевых инноваций (QAAFI) и Австралийского института биоинженерии и нанотехнологий (AIBN), названная

«BioClau» и представляющая собой наночастицы гидротальцита, которые хорошо связывают дцРНК за счет противоположных зарядов молекул. Распыление подобной смеси демонстрирует защиту от воздействия воды и способствует замедленному высвобождению дцРНК, которая может быть обнаружена на обработанных листьях спустя 30 дней. К сожалению, данная технология была апробирована лишь в защите растений табака и гороха от вирусных инфекций (Mitter et al., 2017; Worrall et al., 2019), но вполне вероятно, что она окажется эффективной и для ограничения численности вредных членистоногих.

Среди коммерческих продуктов на основе РНК, появление на рынке которых ожидается в ближайшем будущем, стоит упомянуть технологию «BioDigest» компании Bayer, для которой уже анонсирован широкий спектр применения: защита медоносных пчел от клещей *Varroa* sp., борьба с вредителями сельскохозяйственных культур и сорными растениями, устойчивыми к гербицидам. Компания Syngenta (ChemChina), которая приобрела бельгийскую фирму Devgen, также разрабатывает пестициды на основе РНК против различных наземных и почвенных насекомых-вредителей (Taning et al., 2020).

Важный момент для коммерческого успеха препаратов на основе дцРНК – развитие устойчивости и пути ее преодоления. На настоящий момент собрано не так много информации, задокументирован единственный случай развития резистентности в естественной популяции колорадского жука CEAS 300. Резистентность более чем в 11 000 раз к дцРНК, нацеленной на ген субъединицы А вакуолярной АТФазы, выработалась в результате девяти раундов селекции с использованием распыления на листья (Mishra et al., 2021). Предполагается, что в развитии резистентности может быть задействован неспецифический механизм, обусловленный нокдауном белка StauC. Это один из дцРНК-связывающих белков, подобного белку Loq *D. melanogaster* и задействованным в инициации пути РНКи у жесткокрылых. Снижение экспрессии StauC более чем в два раза в культуре клеток колорадского жука Lepd-SL1RR подавило процессирование дцРНК до кцРНК более чем на 80% (Yoon et al., 2018).

Интъекции в ствол и полив

Полив и внутриводольные интъекции – еще один из подходов *in planta*, позволяющий косвенно воздействовать на вредителя и обеспечивающий системность малых РНК в организме растения за счет их поступления и распространения через проводящую систему. Данный подход можно условно разделить на два в зависимости от метода введения пестицида и основной ткани, вовлеченной в распространение. Полив и орошение подразумевают доставку малых РНК через корневую систему и далее с восходящим током по ксилеме в надземную часть растения. Интъекция в ствол обеспечивает распространение РНК как по ксилеме, так и по флоэме и проникновение её во все органы растения, включая корни. Хотя интъекции в ствол могут быть применены исключительно к древесным культурам, данный метод, за счет вовлечения обоих типов проводящих тканей позволяет воздействовать на более широкий спектр вредителей, включая как сосущих, так и грызущих. Одна из первых работ, использующих данный подход, продемонстрировала свою эффективность в отношении трех видов полужесткокрылых вредителей (*Diaphorina citri*,

Bactericera cockerelli и *Homalodisca vitripennis*) при поливе и интъекциях в ствол цитрусовых культур и винограда. Двухпочечная РНК, специфичная к транскрипту гена аргининкиназы, сохраняла стабильность в растениях мексиканского лайма в течение 7 недель после однократной обработки (2 г очищенной дцРНК на 15 л воды) (Hunter et al., 2012).

Интересный метод доставки дцРНК был предложен Dalakouras и коллегами (Dalakouras et al., 2018) – через черешок листа. К черешку удаленного листа присоединяли емкость с раствором РНК, который поглощался растением. Эксперимент продемонстрировал, что попавшая таким путём в растение дцРНК накапливается в апикальных листьях постепенно, достигая максимума на 10 день после обработки, в то время как интъекция в ствол позволяет ей быстро распространиться по растению (максимум содержания на 1-ый день после обработки) и так же быстро деградировать. Кроме преимущества предложенного метода, авторы смогли выяснить, что поглощение и распространение молекул РНК было опосредовано сосудами ксилемы и апопластическим транспортом.

Внутриводольные интъекции хорошо подходят для садовых культур и для борьбы с насекомыми, питающимися на корнях или вредителями древесины. Для облегчения процедуры интъекций уже существуют коммерческие системы, например Arborjet®, позволяющие быстро и с наименьшим уроном для дерева ввести препарат (Joga et al., 2016). Использование дцРНК при поливе или орошении удобно в использовании, но ограничивается скоростью деградации дцРНК в почве, которая влияет на эффективность РНК-интерференции (Dubelman et al., 2014; Joga et al., 2016).

Использование малых РНК в качестве средств защиты растений подразумевает и решение вопроса их получения в производственных масштабах. Химический синтез и очистка представляются дорогостоящими. Альтернативой в этой ситуации служит биотехнологическое производство – экспрессия дцРНК в бактериальных культурах. Ряд исследований доказали эффективность использования дцРНК, полученной в *Esherichia coli*, при кормлении личинок и имаго различных вредителей (Zotti et al., 2018; Joga et al., 2016; Li et al., 2011; Ahn et al., 2019). По всей видимости данный подход используется коммерческими компаниями, испытывающими дцРНК. В частности, об использовании микробной системы сообщает ранее упоминавшаяся компания RNAiSSANCE Ag LLC. Более того, было показано, что выделение дцРНК из бактерий не обязательно, возможно использование бактериальной суспензии для пероральной доставки и запуска РНК-интерференции (Zhu et al., 2011; Ganbaatar et al., 2017; Ai et al., 2018).

Вирус-индуцированный сайленсинг генов (VIGS)

Фитопатогенные вирусы способны самостоятельно запускать механизм РНК-интерференции в растительной клетке, которая обеспечивает естественную систему противовирусной защиты растения (Максимов и др., 2021; Sasaya et al., 2013). Вместе с тем непатогенные штаммы можно использовать в качестве векторов для доставки и запуска дцРНК в растении для защиты от насекомых-вредителей (Cagliari et al., 2019). Вирус-индуцированный сайленсинг генов (англ. VIGS, *virus-induced gene silencing*)

уже сейчас широко применяется в функциональной геномике растений. Он имеет высокий потенциал в прикладном использовании, поскольку обладает рядом преимуществ таких как высокая эффективность, в том числе за счет того, что многие фитопатогенные вирусы имеют РНК-геном. VIGS не приводит к изменениям в геноме самого растения, а трансформация имеет временный характер. Тем не менее эффект может передаваться в поколениях и характеризуется системностью (Baulcombe, 2015). Однако вопрос принятия данной системы развития устойчивости обществом по аналогии с ГМ-продуктами остается открытым и может быть серьезным препятствием при использовании в промышленном растениеводстве. Классическое применение данного подхода подразумевает вирусную трансформацию самих растений, наработку дцРНК и поглощение ее вредителем в ходе питания. Так успешное получение рекомбинантного вектора на основе вируса тристеа цитрусовых (CTV) позволило повысить смертность и снизить способность к полету имаго азиатской цитрусовой листоблошки *D. citri* за счет деформации крыльев. Данный вид псиллид служит основным переносчиком бактерий рода *Liberibacter* sp., которые вызывают пожелтение цитрусовых, или «болезнь желтого дракона» (Najeri et al., 2014). Другой пример применения VIGS – получение вектора на основе вируса X картофеля (PVX), несущего фрагменты гена вакуолярной АТФазы и гена, ответственного за синтез бурсикона у хлопкового мучнистого червеца *Phenacoccus solenopsis*. Биотесты, проведенные на растениях табака, показали, что особи, питающиеся на обработанных растениях, либо погибли, либо их имаго имели серьезные патоморфологические изменения (Khan et al., 2018).

В последние десятилетия значительное развитие получили исследования виroma насекомых как за счет развития технологий высокопроизводительного секвенирования, так и благодаря внедрению биоинформатических подходов и компьютерных приложений (Bonning, 2020; Nouri et al., 2018). Использование энтомопатогенных вирусов может служить альтернативой стратегии *in planta* и позволит напрямую доставлять эффекторы РНК-интерференции в организм вредителя и крайне перспективно для использования на видах, невосприимчивых к поглощению экзогенной дцРНК. Исследование способности

рекомбинантного Флокхаус вируса (FHV) напрямую подавлять активность генов-мишеней в культуре клеток S2 и у имаго *D. melanogaster* показало снижение уровня транскриптов более чем на 70% и высокую смертность по сравнению с вирусом дикого типа (Taning et al., 2018).

Недостатком применения фито- или энтомопатогенных вирусов для запуска РНКи может стать их способность кодировать супрессоры РНК-интерференции, которые служат естественными компонентами преодоления противовирусной защиты организма-хозяина, особенно это характерно для вирусов растений. Альтернативой классическим вирусным векторам могут служить вирусоподобные частицы (VLP), которые представляют собой белковый капсид, несущий фрагмент гена для инициации экспрессии дцРНК и запуска пути РНК-интерференции (Koliopoulou et al., 2017). VLP могут нарабатываться в микроорганизмах и обладают способностью к самосборке, что позволяет интегрировать дцРНК внутри частицы при их совместной экспрессии в бактериальных клетках (Hoffmann et al., 2016). Данная система способна обеспечить эффективное клеточное поглощение и защиту дцРНК во внеклеточной среде насекомого, но лишена недостатков классических вирусных векторов (Christiaens et al., 2020).

Сайленсинг гена,

опосредованный симбиотическими организмами

Стратегия, имеющая много общего с использованием рекомбинантных энтеробактерий в составе спреев. Рекомбинантные штаммы симбиотических бактерий способны индуцировать устойчивую РНКи в организме насекомого-мишени и обеспечить еще большую специфичность действия за счет особенностей взаимоотношений в системе «симбионт-хозяин». В исследовании Whitten с соавторами (Whitten et al., 2016) демонстрируется подавление экспрессии гена альфа цепи тубулина западного цветочного трипса (*Frankliniella occidentalis*) при помощи энтеробактериального штамма *F. occidentalis* BFo2. Дефицитные по РНКазе III бактерии-симбионты вводили насекомым различных возрастов с помощью искусственного питательного раствора. Наибольшая смертность, вызванная симбионт-опосредованной РНКи, наблюдалась среди личинок первого возраста в течение четырех дней после введения симбиотов.

Заключение

Технология РНКи в борьбе с вредителями начинает внедряться в практику растениеводства, не ограничиваясь исключительно теоретическими исследованиями. Существенным препятствием для его масштабного применения остаются вопросы синтеза эффекторов пути РНКи, а главное сохранения их стабильности в окружающей среде и организме растений и вредителей в зависимости от способа доставки. Помимо этого, придется считаться с тем, что не все насекомые восприимчивы к РНКи. Эффективность данной технологии может отличаться у представителей разных отрядов, семейств и даже родов. Это ставит перед исследователями ещё одну серьезную задачу в области исследования механизмов поглощения и метаболизма малых РНК у насекомых – выяснение

наиболее восприимчивых стадий жизненного цикла и особенностей физиологии, которые могут оказывать влияние на эффективность ответа и трансгенерационные эффекты. Несмотря на очевидное с научной точки зрения отсутствие токсичности для нецелевых объектов, технология управления активностью генов может также вызвать непонимание и неприятие со стороны общества. Тем не менее, нет сомнений в том, что благодаря своей доказанной эффективности, не только в отношении членистоногих вредителей, но и различных фитопатогенов, пестициды на основе малых РНК уже в скором времени существенно обогатят арсенал средств и способов защиты растений.

Библиографический список (References)

- Кирпичникова АА, Чень Т, Романюк ДА, Емельянов ВВ и др (2016) Особенности регуляции вакуолярной H⁺-АТФазы растительных клеток. *Biological Communications* 3(2):149–160. <https://doi.org/10.21638/11701/spbu03.2016.212>.
- Макарова ЮА, Крамеров ДА (2007) Некодирующие РНК. *Биохимия* 72(11):1427–1448.
- Максимов ИВ, Шеин МЮ, Бурханова ГФ (2021) РНК-интерференция в защитных системах растений. *Физиология растений* 68(4):356–370.
- Ahn SJ, Donahue K, Koh Y, Martin RR et al (2019) Microbial-Based Double-Stranded RNA Production to Develop Cost-Effective RNA Interference Application for Insect Pest Management. *Int J Insect Sci* <http://doi.org/10.1177/1179543319840323>
- Ai X, Wei Y, Huang L, Zhao J et al (2018) Developmental control of *Helicoverpa armigera* by ingestion of bacteria expressing dsRNA targeting an arginine kinase gene. *Biocontrol Sci Technol* 28: 253–267 <http://doi.org/10.1080/09583157.2018.1441368>
- Albright VC, Wong CR, Hellmich RL, Coats JR (2017) Dissipation of double-stranded RNA in aquatic microcosms. *Environ Toxicol Chem* 36(5):1249–1253 <http://doi.org/10.1002/etc.3648>
- Ameres SL, Hung JH, Xu J, Weng Z et al (2011) Target RNA-directed tailing and trimming purifies the sorting of endo-siRNAs between the two *Drosophila* Argonaute proteins. *RNA* 17(1):54–63. <http://doi.org/10.1261/rna.2498411>
- Ameres SL, Zamore PD (2013) Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(8):475–488. <http://doi.org/10.1038/nrm3611>
- Andrade EC, Hunter WB (2016) RNA interference – natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC). In: Abdurakhmonov IY (ed) RNA interference. InTech. 391–409
- Andrade EC, Hunter WB (2017) RNAi feeding bioassay: development of a non-transgenic approach to control Asian citrus psyllid and other hemipterans. *Entomol Exp Appl* 162:389–396. <https://doi.org/10.1111/eea.12544>
- Araujo RN, Santos A, Pinto FS, Gontijo NF (2006) RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem Mol Biol* 36(9):683–693. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.05.012>
- Battistini C, Tamagnone L (2016) Transmembrane semaphorins, forward and reverse signaling: have a look both ways. *Cell Mol Life Sci* 73(8): 1609–1622. <http://doi.org/10.1007/s00018-016-2137-x>
- Baulcombe DC (2015) VIGS, HIGS and FIGS: small RNA silencing in the interactions of viruses or filamentous organisms with their plant hosts. *Curr Opin Plant Biol* 26:141–146. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.06.007>
- Bolognesi R, Ramaseshadri P, Anderson J, Bachman P (2012) Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLOS ONE* 7:e47534. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0047534>
- Bonning BC (2020) The Insect Virome: Opportunities and Challenges. *Curr Issues Mol Biol* 34:1–12. <http://doi.org/10.21775/cimb.034.001>
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P et al (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320(5880):1185–1190. <http://doi.org/10.1126/science.1159151>
- Cagliari D, Dias NP, Galdeano DM, Dos Santos EÁ (2019) Management of Pest Insects and Plant Diseases by Non-Transformative RNAi. *Front Plant Sci* 10:1319. <http://doi.org/10.3389/fpls.2019.01319>
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136(4):642–655. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Christiaens O, Whyard S, Vélez AM, Smagghe G (2020) Double-Stranded RNA Technology to Control Insect Pests: Current Status and Challenges. *Front Plant Sci* 11:451. <http://doi.org/10.3389/fpls.2020.00451>
- Cikaluk DE, Tahbaz N, Hendricks LC, DiMattia GE et al (1999) GERp95, a membrane-associated protein that belongs to a family of proteins involved in stem cell differentiation. *Mol Biol Cell* 10(10):3357–3372. <http://doi.org/10.1091/mbc.10.10.3357>
- Cooper AM, Silver K, Zhang J, Park Y et al (2019) Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest Manag Sci* 75(1):18–28. <http://doi.org/10.1002/ps.5126>
- Dalakouras A, Jarausch W, Buchholz G, Bassler A et al (2018) Delivery of Hairpin RNAs and Small RNAs Into Woody and Herbaceous Plants by Trunk Injection and Petiole Absorption. *Front Plant Sci* 9:1253. <http://doi.org/10.3389/fpls.2018.01253>
- Dubelman S, Fischer J, Zapata F, Huizinga K et al (2014) Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. *PLoS One* 9(3):e93155. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0093155>
- Fire A, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG (1991) Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 113:503–514
- Fire A., Xu S., Montgomery MK, Kostas SA et al (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806–811. <http://doi.org/10.1038/35888>
- Ganbaatar O, Cao B, Zhang Y, Bao et al (2017) Knockdown of *Mythimna separata* chitinase genes via bacterial expression and oral delivery of RNAi effectors. *BMC Biotechnol* 17(1):9. <http://doi.org/10.1186/s12896-017-0328-7>
- Gene-Silencing Pesticides Risks and Concerns. Eva Sirinathsinghi, Kendra Klein, Dana Perls. <https://foe.org/resources/gene-silencing-pesticides-risks-and-concerns/> (02.02.2022)
- Goulin EH, Galdeano DM, Granato LM, Matsumura EE et al (2019) RNA interference and CRISPR: Promising approaches to better understand and control citrus pathogens. *Microbiol Res* 226:1–9. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.006>
- GreenLight Biosciences Going Public to Fund RNA Product Pipeline. <https://www.ncbiotech.org/news/greenlight-biosciences-going-public-fund-rna-product-pipeline> (02.02.2022)
- Gutbrod MJ, Martienssen RA (2020) Conserved chromosomal functions of RNA interference. *Nat Rev Genet* 21(5):311–331. <http://doi.org/10.1038/s41576-019-0203-6>

- Hajeri S, Killiny N, El-Mohtar C, Dawson WO et al (2014) Citrus tristeza virus-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). *J Biotechnol* 176:42–49. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.02.010>
- He B, Chu Y, Yin M, Müllen K et al (2013) Fluorescent nanoparticle delivered dsRNA toward genetic control of insect pests. *Adv Mater* 25(33):4580–4584. <http://doi.org/10.1002/adma.201301201>
- Head GP, Carroll MW, Evans S., Rule DM et al (2017). Evaluation of SmartStax and SmartStaxPRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. *Pest Manag Sci* 73:1883–1899. <http://doi.org/10.1002/ps.4554>
- Hoffmann DB, Böker KO, Schneider S, Eckermann-Felkl E et al (2016) In Vivo siRNA Delivery Using JC Virus-like Particles Decreases the Expression of RANKL in Rats. *Mol Ther Nucleic Acids* 5(3):e298. <http://doi.org/10.1038/mtna.2016.15>
- Horwich MD, Li C, Matranga C, Vagin V et al (2007) The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr Biol* 17(14):1265–1272. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.030>
- Hunter WB, Glick E, Paldi N, Bextine BR (2012) Advances in RNA Interference: DsRNA Treatment in Trees and Grapevines for Insect Pest Suppression. *Soutwest Entomol* 37(1):85–87. <http://doi.org/10.3958/059.037.0110>
- Huntzinger E, Izaurralde E (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 12(2):99–110. <http://doi.org/10.1038/nrg2936>
- Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y et al (2010) Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell* 39(2):292–299. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.015>
- Iwasaki S, Sasaki HM, Sakaguchi Y, Suzuki T et al (2015) Defining fundamental steps in the assembly of the *Drosophila* RNAi enzyme complex. *Nature* 521(7553):533–536. <http://doi.org/10.1038/nature14254>
- Joga MR, Zotti MJ, Smagghe G, Christiaens O (2016) RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. *Front Physiol* 7:553. <http://doi.org/10.3389/fphys.2016.00553>
- Khan AM, Ashfaq M, Khan AA, Naseem MT et al (2018) Evaluation of potential RNA-interference-target genes to control cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Insect Sci* 018;25(5):778–786. <http://doi.org/10.1111/1744-7917.12455>
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115(2):209–216. [http://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00801-8](http://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00801-8)
- Kobayashi H, Tomari Y (2016) RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta* 1859(1):71–81. <http://doi.org/10.1016/j.bbasm.2015.08.007>
- Koch A, Biedenkopf D, Furch A, Weber L et al (2016) An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery. *PLoS Pathog* 12(10):e1005901. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005901>
- Kolliopoulou A, Taning CNT, Smagghe G, Swevers L (2017) Viral Delivery of dsRNA for Control of Insect Agricultural Pests and Vectors of Human Disease: Prospects and Challenges. *Front Physiol* 8:399. <http://doi.org/10.3389/fphys.2017.00399>
- Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K et al (2004) Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117(1):69–81. [http://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00261-2](http://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00261-2)
- Li X, Zhang M, Zhang H (2011) RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PLoS One* 6(3):e17788. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017788>
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG et al (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305(5689):1437–1441. <http://doi.org/10.1126/science.1102513>
- Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F et al (2003) R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* 301(5641):1921–1925. <http://doi.org/10.1126/science.1088710>
- Liu S, Jaouannet M, Dempsey DA, Imani J et al (2020) RNA-based technologies for insect control in plant production. *Biotechnol Adv* 39:107463. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107463>
- Liu X, Jiang F, Kalidas S, Smith D et al (2006) Dicer-2 and R2D2 coordinately bind siRNA to promote assembly of the siRISC complexes. *RNA* 12(8):1514–1520. <http://doi.org/10.1261/rna.101606>
- Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J et al (2008) An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS ONE* 3(10):e3420. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003420>
- Luo J, Liang S, Li J, Xu Z et al (2017) A transgenic strategy for controlling plant bugs (*Adelphocoris suturalis*) through expression of double-stranded RNA homologous to fatty acyl-coenzyme A reductase in cotton. *New Phytol* 215(3):1173–1185. <http://doi.org/10.1111/nph.14636>
- Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP et al (2005) Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123(4):607–620. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.044>
- Matzke MA, Birchler JA (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet* 6(1):24–35. <http://doi.org/10.1038/nrg1500>
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y et al (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15(2):185–197. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.007>
- Mishra S, Dee J, Moar W, Dufner-Beattie J et al (2021) Selection for high levels of resistance to double-stranded RNA (dsRNA) in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) using non-transgenic foliar delivery. *Sci Rep* 11(1):6523 <http://doi.org/10.1038/s41598-021-85876-1>
- Mitter N, Worrall EA, Robinson KE, Li P et al (2017) Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nat Plants* 3:16207. <http://doi.org/10.1038/nplants.2016.207>
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in

- reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant cell* 2:279–289. <http://doi.org/10.1105/tpc.2.4.279>
- Nouri S, Matsumura EE, Kuo YW, Falk BW (2018) Insect-specific viruses: from discovery to potential translational applications. *Curr Opin Virol* 33:33–41. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.07.006>
- Nowara, D, Gay A, Lacomme C, Shaw J et al (2010) HIGS: Host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *Plant Cell* 22(9):3130–41. <http://doi.org/10.1105/tpc.110.077040>
- Orban TI, Izaurralde E (2005) Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* 11(4):459–469. <http://doi.org/10.1261/rna.7231505>
- Pham JW, Pellino JL, Lee YS, Carthew RW et al (2004) A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 117(1):83–94. [http://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00258-2](http://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00258-2)
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T et al (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309(5740):1573–1576. <http://doi.org/10.1126/science.1115079>
- Provost P, Dishart D, Doucet J, Frendewey D et al (2002) Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J* 21(21):5864–5874. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdf578>
- Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X (2005) Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123(4):621–629. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.020>
- RNAi pesticides target an existing pathway in insect pests. [https://www.rnaissanceag.net/solutions/\(24.03.2022\)](https://www.rnaissanceag.net/solutions/(24.03.2022))
- Rodrigues TB, Mishra SK, Sridharan K, Barnes ER et al (2021) First Sprayable Double-Stranded RNA-Based Biopesticide Product Targets Proteasome Subunit Beta Type-5 in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Front Plant Sci* 12:728652. <http://doi.org/10.3389/fpls.2021.728652>
- Romano N, Macino G (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 6:3343–3353. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb02202.x>
- Saito K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC (2005) Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS Biol* 3(7):e235. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030235>
- San Miguel K, Scott JG (2016) The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. *Pest Manag Sci* 72(4):801–809. <http://doi.org/10.1002/ps.4056>
- Schirle NT, MacRae IJ (2012) The crystal structure of human Argonaute2. *Science* 336(6084):1037–1040. <http://doi.org/10.1126/science.1221551>
- Shabalina SA, Koonin EV (2008) Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol Evol* 23(10):578–587. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2008.06.005>
- SmartStax® PRO Technology to Launch. <https://www.bayer.com/en/us/smartstaxr-pro-technology-launch> (02.02.2022)
- Song MS, Rossi JJ (2017) Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *Biochem J* 474(10):1603–1618. <http://doi.org/10.1042/BCJ20160759>
- Sasaya T, Nakazono-Nagaoka E, Saika H, Aoki H et al (2013) Transgenic strategies to confer resistance against viruses in rice plants. *Front. Microbiol* 4:1–11. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00409>
- Thakur N, Upadhyay SK, Verma PC, Chandrashekar K et al (2014) Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase A gene. *PLoS One* 9(3):e87235. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0087235>
- Taning CN, Arpaia S, Christiaens O, Dietz-Pfeilstetter A et al (2020) RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market. *Pest Manag Sci* 76(3):841–845. <http://doi.org/10.1002/ps.5686>
- Taning CNT, Christiaens O, Li X, Swevers L et al (2018) Engineered Flock House Virus for Targeted Gene Suppression Through RNAi in Fruit Flies (*Drosophila melanogaster*) in Vitro and in Vivo. *Front Physiol* 9:805. <http://doi.org/10.3389/fphys.2018.00805>
- TechAccel and Donald Danforth Center Launch RNAissance to Create Environmentally-Friendly Pesticides. <https://agfundernews.com/techaccel-and-donald-danforth-center-found-rnaissance-to-create-environmentally-friendly-pesticides> (02.02.2022)
- Tomari Y, Du T, Zamore PD (2007) Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* 130(2):299–308. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.057>
- Tomari Y, Zamore PD (2005) Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19(5):517–529. <http://doi.org/10.1101/gad.1284105>
- Turner CT, Davy MW, MacDiarmid RM, Plummer KM et al (2006) RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecul Biol* 15:383–91. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00656.x>
- Ufaz S, Balter A, Tzror C, Einbender S et al (2018) Anti-viral RNAi nanoparticles protect shrimp against white spot disease. *Mol Syst Des Eng* 3:38–48. <http://doi.org/10.1039/C7ME00092H>
- Whitten MM, Facey PD, Del Sol R, Fernandez-Martinez L et al (2016) Symbiont-mediated RNA interference in insects. *Proc Biol Sci* 283(1825):20160042 <http://doi.org/10.1098/rspb.2016.0042>
- Worrall E, Bravo-Cazar A, Nilon AT, Fletcher SJ et al (2019) Exogenous Application of RNAi-Inducing Double-Stranded RNA Inhibits Aphid-Mediated Transmission of a Plant Virus. *Front Plant Sci* 10: 265. <http://doi.org/10.3389/fpls.2019.00265>
- Yoon JS, Gurusamy D, Palli SR (2017) Accumulation of dsRNA in endosomes contributes to inefficient RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem Mol Biol* 90:53–60. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.09.011>
- Yoon JS, Mogilicherla K, Gurusamy D, Chen X et al (2018) Double-stranded RNA binding protein, Staufen, is required for the initiation of RNAi in coleopteran insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(33):8334–8339 <http://doi.org/10.1073/pnas.1809381115>
- Zhang J, Khan SA, Hasse C, Ruf S et al (2015) Pest control. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science* 347(6225):991–994. <http://doi.org/10.1126/science.1261680>
- Zhang Y, Cui J, Zhou Y, Cao J et al (2018) Liposome mediated double-stranded RNA delivery to silence ribosomal protein

- P0 in the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Ticks Tick Borne Dis* 9(3):638–644. <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.01.015>
- Zhang X, Mysore K, Flannery E, Michel K et al. (2015). Chitosan/interfering RNA nanoparticle mediated gene silencing in disease vector mosquito larvae. *J Vis Exp* 97:52523. <http://doi.org/10.3791/2523>
- Zhang X, Zhang J, Zhu, KY (2010) Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Mol Biol*. 19:683–693. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01029.x>
- Zheng Y, Hu Y, Yan S, Zhou H et al (2019) A polymer/detergent formulation improves dsRNA penetration through the body wall and RNAi-induced mortality in the soybean aphid *Aphis glycines*. *Pest Manag Sci* 75(7):1993–1999. <http://doi.org/10.1002/ps.5313>
- Zhu F, Xu J, Palli R, Ferguson J et al (2011) Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Manag Sci* 67(2):175–82. <http://doi.org/10.1002/ps.2048>
- Zhu KY, Palli SR (2020) Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference. *Annu Rev Entomol* 65:14.1–14.19 <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-02522>
- Zotti M, Dos Santos EA, Cagliari D, Christiaens O et al (2018) RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Manag Sci* 74(6):1239–1250. <https://doi.org/10.1002/ps.4813>

Translation of Russian References

- Kirpichnikova A, Chen T, Romanyuk D, Yemelyanov V et al (2016) Peculiar features of plant cell vacuolar H⁺-ATPase regulation. *Biological Communications* 3(2): 149–160 <https://doi.org/10.21638/11701/spbu03.2016.212>
- Makarova YA, Kramerov DA (2007) Non-coding RNAs. *Biochemistry* 72(11):1427–1448.
- Maksimov IV, Shein MY, Burkhanova GF (2021) RNA interference in plant defense mechanisms. *Plant Physiology* 68(4):356–370. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-1-15219>

Plant Protection News, 2022, 105(1), p. 28–39

OECD+WoS: 4.01+AM (Agronomy)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-1-15219>

Mini-review

RNA INTERFERENCE METHOD IN PLANT PROTECTION AGAINST INSECT PESTS

V.S. Zhuravlev*, V.V. Dolgikh, S.A. Timofeev, F.B. Gannibal

All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

**corresponding author, e-mail: v.guravlev@hotmail.com*

RNA-interference, or suppression of gene expression by small RNAs, was originally described in *Caenorhabditis elegans* in 1998 and is currently widely considered for use in plant protection. The use of double-stranded RNA molecules as an inducer of the RNA interference pathway in insect pests potentially allows employing them as active ingredients in modern pesticides. Genetically modified crops expressing dsRNA have been developed as commercial products with a great potential in insect pest management. Alternatively, some nontransformative approaches, including foliar spray and chemigation, are also suitable for practical applications. This review explains the mechanism of artificially induced RNA interference and existing strategies for the delivery of small RNAs to target insects within the framework of plant protection.

Keywords: small RNAs, RNA pesticides, gene silencing, molecular plant protection

Submitted: 23.01.2022

Accepted: 31.03.2022

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНСЕКТИЦИДОВ ПРОТИВ ВРЕДИТЕЛЕЙ В РАССАДНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ

П.А.Опякин, Г.П. Иванова*

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

* ответственный за переписку, e-mail: galinaivanova-vizr@yandex.ru

Из двух способов выращивания капусты белокочанной на Северо-Западе Российской Федерации более широко используется рассадная технология. Для этой технологии был разработан прием полива рассады в кассетах перед высадкой в поле системным препаратом – неоникотиноидом Актара, ВДГ (250 г/кг тиаметоксама) для защиты капусты от ранневесенних вредителей: крестоцветных блошек р. *Phyllotreta* и весенней капустной мухи. Этот прием активно используется в хозяйствах более 15 лет, в связи с чем возникает необходимость в подтверждении его эффективности в современных условиях. Тестирование препарата Актара, ВДГ в 2019 и 2021 гг. на опытном поле ФГБНУ ВИЗР не выявило существенного снижения биологической эффективности обработки рассады. Параллельно проведена оценка биологической эффективности обработки рассады системными инсектицидами из химического класса карбаматов Ланнат, СП (250 г/кг метомила) и из нового класса изоксазолинов – препарат на основе д.в. изоциклосерам. В течение 21 суток изоциклосерам превосходил эталон Актара, ВДГ в борьбе с крестоцветными блошками и весенней капустной мухой. Наряду с этим, было отмечено снижение заселенности растений капустной молью. Эффективность карбамата Ланнат, СП была существенно ниже. Представляется перспективным дальнейшее изучение инсектицида изоциклосерам для включения в перечень разрешенных на капусте препаратов в борьбе с комплексом вредителей, что даст возможность разработки схем чередования препаратов разного токсического действия в антирезистентных системах защиты культуры.

Ключевые слова: рассада, крестоцветные блошки, весенняя капустная муха, капустная моль, неоникотиноиды, карбаматы, изоксазолины, биологическая эффективность

Поступила в редакцию: 10.02.2022

Принята к печати: 05.04.2022

Введение

Капуста белокочанная *Brassica oleraceae* L. convar. *capitata* (L.) Alef. var. *alba* DC. (Brassicaceae) – одна из наиболее распространенных овощных культур во всем мире благодаря её большой урожайности, высокой транспортабельности, лежкости, устойчивости к неблагоприятным условиям, высоким питательным и диетическим свойствам (Петрушко и др., 2003; Kavita, Narzary, 2015; Prasad, Shivay, 2017; Favela-González et al., 2020; Ray et al., 2021; Uuh-Narvaez, Segura-Campos, 2021). Особенно много капусты белокочанной выращивают в странах с умеренным и прохладным климатом (Warwick et al., 2011; Beacham et al., 2018; Giordano et al., 2011), поэтому в большинстве регионов Российской Федерации, в том числе и на Северо-Западе, она занимает лидирующее место (Минич и др., 2003; Артемьева и др., 2016; Пивоваров и др., 2017).

В настоящее время существует две технологии выращивания капусты белокочанной – безрассадная (БТ) и рассадная (РТ). В первом случае семена высеваются непосредственно в поле, во втором – сначала выращивают рассаду в пленочных обогреваемых теплицах, которую высаживают в поле рассадопосадочными машинами. Каждая технология имеет свои недостатки и преимущества. Для БТ большое значение имеют погодные условия, подготовка почвы, борьба с сорными растениями, предпосевное обеззараживание семян инсектофунгицидами (Прищепа и др., 2008, 2012). По мнению этих авторов, а также Б.П. Асякина (2015), БТ считается менее затратной и широко применяется в Республике Беларусь и южных регионах России. В то же время в условиях Северо-Запада России с неустойчивыми метеоусловиями весенних месяцев, наиболее благоприятных для посева капусты, возможны

затруднения с выходом сельскохозяйственных машин в поле, а при более поздних сроках сева повышается риск неполучения продукции.

Ранее рассада выращивалась на грядках в парниках и укрытиях, растения при выборке часто травмировались, что сказывалось на их устойчивости к фитофагам и фитопатогенам (Асякин, 2015). Однако с внедрением кассетного способа у растения в отдельной кассете формируется хорошо развитая корневая система, и оно меньше травмируется при высадке в поле. В период выращивания рассада обрабатывается микроэлементами и фунгицидными препаратами по технологиям, принятым в хозяйствах. Культивационные сооружения после выборки рассады используются для выращивания различных овощных культур. На наш взгляд, обе технологии имеют право на существование, с учетом возможностей хозяйств. В этом плане присоединяемся к выводам И.А. Прищепы с соавторами: «Сравнительный анализ двух технологий показал, что видовой состав фитофагов не зависит от способа выращивания культуры. Изменяется только соотношение видов и их вредоносность в зависимости от сроков заселения и фазы развития культуры. В частности, плотность и вредоносность крестоцветных блошек и весенней капустной мухи возрастает на посевах капусты, численность и вредоносность листогрызущих вредителей существенно не зависит от способа выращивания капусты» (Прищепа и др., 2012). Полагаем, что задача защиты растений заключается в обеспечении производителей приемами, способными максимально снизить вредоносность фитофагов при любых способах выращивания капусты.

С внедрением кассетного способа был разработан прием полива почвы в кассетах с рассадой перед ее высадкой в поле системным неоникотиноидом Актара, ВДГ (250 г/кг тиаметоксама). Этот прием позволяет защищать культуру после высадки рассады в поле от ранневесенних вредителей: крестоцветных блошек р. *Phyllotreta*, весенней капустной мухи *Delia brassicae* Vouche (Белых и др., 2004; Долженко и др., 2008), который в настоящее время широко используется в хозяйствах, выращивающих капусту белокочанную. При маршрутных обследованиях производственных посадок капусты белокочанной и по данным специалистов хозяйств снижение эффективности препарата пока не наблюдалось, но, поскольку с момента внедрения этой технологии прошло более 15 лет, экспериментальная проверка представляется целесообразной. Также очевидна и необходимость поиска других системных препаратов для формирования полноценного ассортимента средств защиты культуры от вредителей.

Материалы и методы

Работа выполнялась в 2019 и 2021 гг. на опытном поле ФГБНУ ВИЗР общей площадью 4.6 га. Поле расположено на территории института и непосредственно граничит с полями бывшего совхоза «Ленсоветовский» Ленинградской области. Расстояние до производственных посадок капустных культур (ПЗ «Детскосельский», Опытное поле Пушкинских лабораторий ВИР) в пределах 5–10 км, что не может служить препятствием для миграций таких вредителей, как капустные мухи, капустная моль, белянки на опытном поле института. Ежегодно на поле выращиваются культуры разных семейств, в т.ч. капустные: капуста белокочанная и яровой рапс. По обочинам поля растут сорные растения этого же семейства: дикая редька, сурепка, горчица, на растительных остатках которых зимуют, а на отрастающих растениях питаются после выхода из зимовки фитофаги, в том числе крестоцветные блошки. Таким образом, за много лет на поле сформировался, в дополнение к мигрантам, и собственный комплекс фитофагов капусты белокочанной, вполне репрезентативный для ее промышленных посадок. Численность вредителей представляется достаточной для проведения исследований по оценке использования средств защиты. Важная особенность исследований в условиях опытного поля ВИЗР заключается в использовании контрольного варианта в течение всего периода вегетации, что не представляется возможным в современных промышленных посадках.

В исследования были включены ранние (Колобок и Конкэрон F₁) и поздние (Эластор и Сторема) сорта и гибриды капусты белокочанной, возделываемые в хозяйствах Ленинградской области. Рассада выращивалась в ЗАО «Предпортовый» по принятой в хозяйстве технологии. Обработку рассады изучаемыми препаратами проводили в теплицах ФГБНУ ВИЗР за 1 сутки до высадки в поле с помощью ранцевого опрыскивателя «Solo 456» с расходом рабочей жидкости согласно производственной рекомендации – 1 л/м² площади кассет с рассадой. После высадки рассады проводили подкормки, рыхления и культивации поля по принятой в Ленинградской области технологии выращивания капусты белокочанной.

Опыты закладывались в четырехкратной повторности. Площадь делянки 25 м², расположение рандомизированное.

Цель нашего исследования заключается в проверке биологической эффективности обработки рассады капусты белокочанной в кассетной технологии неоникотиноидом Актара, ВДГ против ранневесенних вредителей (крестоцветных блошек и весенней капустной мухи), а также оценка биологической эффективности обработки рассады системными инсектицидами из химического класса карбаматов Ланнат, СП (250 г/кг метомила) и представителя класса изоксазолинов – препарата на основе д.в. изоцикросерам. Поскольку Ланнат, СП и изоцикросерам обладают активностью в отношении не только жесткокрылых и двукрылых, но и чешуекрылых фитофагов, мы оценили влияние профилактической обработки растений этими инсектицидами на заселенность гусеницами капустной моли *Plutella xylostella* L. Это связано с тем, что по нашим наблюдениям, появление гусениц первого поколения капустной моли, как правило, происходит в фазу мутовки в пределах месяца после высадки рассады.

Учеты проводили согласно методикам, принятым при проведении регистрационных испытаний инсектицидов в борьбе с вредителями капусты (Иванова и др., 2009; Долженко и др., 2009). Биологическую эффективность препаратов рассчитывали по снижению численности вредителей относительно контроля по формуле Аббота. Учеты выпадов растений от повреждений весенней капустной мухой проводили во время максимального проявления их поврежденности – на 42 сутки после высадки рассады. Дополнительно в начале заселения растений капусты молью на 25 растениях подсчитывалось число гусениц на растение. Так, в опытах 2019 г. при обработке рассады 30 мая заселение растений капустной молью наблюдалось 10 июня, в 2021 г. – 10 июня и 7 июля, соответственно. Для дисперсионного анализа полученных данных использовали пакет прикладных программ MS Excel. Метеорологические условия в период проведения опытов значительно различались (табл. 1), что, естественно, сказывалось на сроках заселения растений капусты белокочанной вредителями и их численности.

По нашим наблюдениям, ориентировочно в пределах месяца, после высадки рассады в поле она начинает заселяться гусеницами капустной моли. Действующее вещество неоникотиноида Актара, ВДГ не обладает активностью в отношении чешуекрылых вредителей (Долженко, 2009). Чтобы оценить возможность снижения численности капустной моли, в исследования 2019 г. был включен инсектицид из класса карбаматов Ланнат, СП (250 г/кг метомила), также характеризующийся системными свойствами, но обладающий активностью не только в отношении жесткокрылых и двукрылых, но и чешуекрылых вредителей. Препарат разрешен для применения на капусте белокочанной в период вегетации против капустной моли.

В 2021 г., помимо препарата Актара, ВДГ, оценивали эффективность при обработке рассады препаратом на основе д.в. изоцикросерам из нового химического класса изоксазолинов. Этот инсектицид испытывается в настоящее время в кассетной технологии против крестоцветных блошек и весенней капустной мухи, а также в период вегетации против капустной моли.

Таблица 1. Метеорологические данные периодов вегетации 2019 и 2021 гг. (Ленинградская область)

| Показатели | Месяцы, декады | | | | | | | | |
|------------------------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | май | | | июнь | | | июль | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Температура воздуха, °С | | | | | | | | | |
| Среднеголетнее | 8.5 | 11.1 | 12.3 | 14.3 | 15.7 | 16.6 | 17.3 | 17.8 | 17.9 |
| 2019 | 8.0 | 13.7 | 13.6 | 19.4 | 16.9 | 17.6 | 14.0 | 15.3 | 18.4 |
| 2021 | 5.7 | 17.6 | 11.4 | 18.0 | 19.8 | 24.2 | 23.4 | 24.2 | 19.6 |
| Осадки, мм | | | | | | | | | |
| Среднеголетнее | 10.3 | 12.2 | 14.7 | 13.8 | 17.0 | 24.5 | 22.1 | 21.2 | 22.7 |
| 2019 | 19.3 | 7.1 | 15.5 | 3.8 | 0.5 | 4.7 | 15.4 | 27.7 | 1.5 |
| 2021 | 45.0 | 40.9 | 38.1 | 0 | 5.8 | 19.6 | 7.9 | 10.1 | 25.9 |
| Относительная влажность воздуха, % | | | | | | | | | |
| Среднеголетнее | 67 | 73 | 71 | 66 | 68 | 71 | 72 | 74 | 76 |
| 2019 | 59 | 57 | 63 | 53 | 64 | 66 | 69 | 68 | 63 |
| 2021 | 73 | 60 | 69 | 51 | 55 | 61 | 52 | 54 | 59 |

Table 1. Meteorological conditions during vegetation periods in 2019 and 2021 (Leningrad region)

| Indices | Months, ten-day periods | | | | | | | | |
|--------------------------|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | May | | | June | | | July | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Ambient temperature, °C | | | | | | | | | |
| Average perennial | 8.5 | 11.1 | 12.3 | 14.3 | 15.7 | 16.6 | 17.3 | 17.8 | 17.9 |
| 2019 | 8.0 | 13.7 | 13.6 | 19.4 | 16.9 | 17.6 | 14.0 | 15.3 | 18.4 |
| 2021 | 5.7 | 17.6 | 11.4 | 18.0 | 19.8 | 24.2 | 23.4 | 24.2 | 19.6 |
| Precipitation, mm | | | | | | | | | |
| Average perennial | 10.3 | 12.2 | 14.7 | 13.8 | 17.0 | 24.5 | 22.1 | 21.2 | 22.7 |
| 2019 | 19.3 | 7.1 | 15.5 | 3.8 | 0.5 | 4.7 | 15.4 | 27.7 | 1.5 |
| 2021 | 45.0 | 40.9 | 38.1 | 0 | 5.8 | 19.6 | 7.9 | 10.1 | 25.9 |
| Relative air humidity, % | | | | | | | | | |
| Average perennial | 67 | 73 | 71 | 66 | 68 | 71 | 72 | 74 | 76 |
| 2019 | 59 | 57 | 63 | 53 | 64 | 66 | 69 | 68 | 63 |
| 2021 | 73 | 60 | 69 | 51 | 55 | 61 | 52 | 54 | 59 |

Результаты

В мае вегетационного сезона 2019 г. отмечалась умеренная (ниже или на уровне средних многолетних) температура воздуха и осадки (табл. 1). Условия не были благоприятны для размножения крестоцветных блошек, вследствие чего заселение рассады капусты этими вредителями не наблюдалось на протяжении всего периода вегетации ни в одном варианте опыта как на раннем сорте Казачок, так и на позднем сорте Эластор.

Заселение растений весенней капустной мухой различалось по сортам. Так, выпадов растений на сорте Казачок было в 1.9 раз больше, чем на сорте Эластор (табл. 2). Сортные различия заселения были достоверны: фактический критерий Фишера (13.1) был выше теоретического (10.13). В зависимости от уровня заселенности различалась и эффективность препаратов. Снижение количества выпадов в варианте с инсектицидом Актара, ВДГ по отношению к контролю на сорте Казачок составляло 76.3%, на сорте Эластор – 85.0%. Обработка рассады инсектицидом Ланнат, СП, при высоких нормах применения относительно других пестицидов, не выявила каких-либо преимуществ в снижении заселенности растений весенней капустной мухой (табл. 2).

Полученные нами данные по инсектициду Актара ВДГ, в целом, соответствуют эффективности этого приема при внедрении его в практику. По опубликованным ранее

материалам снижение численности блошек при достаточно слабом уровне заселенности (0.2–2.0 особи /10 растений в контроле) составляло на сорте Краутман от 100% (7 сутки после высадки рассады) до 33.4% (14 сутки после высадки), на сорте Агрессор – 100% и 72.5%, соответственно. Снижение количества выпадов от весенней капустной мухи на 42 сутки (максимальное проявление поврежденности) на сорте Краутман было 66.7%, на сорте Агрессор – 60.0% (Белых и др., 2004; Долженко и др., 2008).

Анализ материалов по инсектициду Ланнат, СП (250 г/кг) не выявил каких-либо преимуществ в борьбе с капустной мухой перед препаратом Актара, ВДГ, включенным в Каталог в борьбе с этим вредителем (Государственный каталог..., 2021).

При оценке заселенности растений гусеницами капустной моли, которая была проведена спустя месяц после применения инсектицидов в рассаде, не выявлено какого-либо заметного снижения численности фитофага от обработки (табл. 2). Хотя некоторое снижение числа гусениц в варианте инсектицида Ланнат, СП имеет место, но не столь значительное, как мы полагали. Таким образом, спустя месяц после применения токсическое действие препарата ослабевает и его количества недостаточно для проявления активности в отношении капустной моли.

Таблица 2. Эффективность инсектицидов в борьбе с вредителями капусты белокочанной в рассадной технологии ее выращивания (Ленинградская обл., опытное поле ВИЗР, 2019 г.)

| Вариант обработки рассады | Норма применения препарата, кг/га | Весенняя капустная муха | | Капустная моль Количество гусениц, экз./раст. |
|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--|
| | | Доля выпавших растений на 42 сутки, % | Снижение по отношению к контролю, % | |
| Сорт Казачок | | | | |
| Актара, ВДГ (250 г/кг) | 0.3 | 10.0 | 76.3 | 1.45 |
| Ланнат, СП (250 г/кг) | 0.5 | 18.0 | 52.6 | 1.3 |
| Ланнат, СП (250 г/кг) | 1.0 | 10.0 | 76.3 | 1.25 |
| Контроль | - | 38.0 | - | 1.4 |
| НСР₀₅ | | 20.3 | - | Не существенно |
| Сорт Эластор | | | | |
| Актара, ВДГ (250 г/кг) | 0.3 | 3.0 | 85.0 | 0.9 |
| Ланнат, СП (250 г/кг) | 0.5 | 5.0 | 75.0 | 0.9 |
| Ланнат, СП (250 г/кг) | 1.0 | 5.0 | 75.0 | 0.5 |
| Контроль | - | 20.0 | - | 1.0 |
| НСР₀₅ | | 12.8 | - | Не существенно |

Table 2. Efficacy of insecticides against pests of white cabbage grown using seedling technology (Leningrad region, experimental field of All-Russian Institute of Plant Protection, 2019)

| Seedlings treatment | Formulation dosage, kg/ga | Cabbage root fly | | Diamondback moth Number of larvae per plant |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|--|
| | | Quote of perished plants by day 42, % | Decrease as compared to control, % | |
| Variety Kazachok | | | | |
| Actara, WDG (250 g/kg) | 0.3 | 10.0 | 76.3 | 1.45 |
| Lannate, WSP (250 g/kg) | 0.5 | 18.0 | 52.6 | 1.3 |
| Lannate, WSP (250 g/kg) | 1.0 | 10.0 | 76.3 | 1.25 |
| Control | - | 38.0 | - | 1.4 |
| LSD₀₅ | | 20.3 | - | Not significant |
| Variety Elastor | | | | |
| Actara, WDG (250 g/kg) | 0.3 | 3.0 | 85.0 | 0.9 |
| Lannate, WSP (250 g/kg) | 0.5 | 5.0 | 75.0 | 0.9 |
| Lannate, WSP (250 g/kg) | 1.0 | 5.0 | 75.0 | 0.5 |
| Control | - | 20.0 | - | 1.0 |
| LSD₀₅ | | 12.8 | - | Not significant |

Оценка эффективности использования инсектицида Актара, ВДГ в рассадной технологии капусты белокочанной была продолжена в 2021 г. Вегетационный период этого года для капустных культур оказался чрезвычайно сложным. Так, большое количество осадков в апреле и мае задерживали подготовку полей под посадку капусты, в результате чего оптимальные сроки посадки были нарушены (табл. 1). В июне и июле осадки практически отсутствовали, а температура воздуха значительно превышала средние многолетние значения, что угнетающе действовало на растения и вызывало необходимость проведения частых поливов. Сложившиеся погодные условия оказали неблагоприятное влияние не только на растения, но и на заселение их крестоцветными блошками и развитие насекомых. Их численность была сравнительно низкой, но заселенность растений составляла 100%. Жуки концентрировались в точке роста, что даже при невысокой численности

усиливало их вредоносность. Погодные условия способствовали гибели отложенных имаго весенней капустной мухи яиц и снижали рождаемость из них личинок. Численность личинок была невысокой (1–2 на растение) и полной гибели поврежденных фитофагом растений обоих сортов не наблюдалось.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности инсектицида Актара, ВДГ при обработке рассады за 1 день до высадки в поле против крестоцветных блошек (табл. 3, а). На протяжении 14 суток после высадки рассады наблюдалась 100% гибель блошек на обоих сортах капусты. В то же время необходимо отметить, что при снижении общей численности блошек в контрольных вариантах, к 21 суткам происходило заселение ими обработанных растений и показатели биологической эффективности снижались, соответственно сортам, до 72.0 и 75.0% (табл. 3, а). Это свидетельствует о начале снижения

длительности защитного действия инсектицида и о необходимости дальнейшего наблюдения за этим процессом.

Что касается заселенности растений весенней капустной мухой в условиях 2021 г., то, как мы отмечали выше, выпадов растений не наблюдалось. К 21 суткам учетов не было отмечено угнетенных растений на гибриде Конкэрон F₁, на сорте Сторема они также были единичны (табл. 3, б).

В 2021 г. на сорте Сторема была исследована также эффективность обработки рассады капусты белокочанной в кассетах препаратом на основе д.в. изоцикloserам из нового химического класса изоксазолинов, который проходил регистрационные испытания как в рассадной технологии, так и против капустной моли в период вегетации. Препарат применяли в двух нормах – 60 и 120 г/га (в пересчете на д.в.), эталоном служил пестицид Актара, ВДГ. Несмотря на то, что оба препарата влияют на нервную систему насекомых, они обладают разным механизмом действия: тиаметоксам подавляет активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ), являясь агонистом никотин-ацетилхолиновых рецепторов постсинаптической мембраны, пролонгирует открытие натриевых каналов, при этом блокируется передача нервного импульса (Cabirol, Naase, 2019; Zhang et al., 2020). Изоцикloserам блокирует нейро-мышечные контакты и ГАМК-зависимые рецепторы, приводит нейроны в состояние гипервозбуждения, нарушает передачу нервных импульсов (Cassayge et al., 2021).

Показатели эффективности инсектицида изоцикloserам в отношении крестоцветных блошек (табл. 4) составляли 59.6–72.7–70.0–41.7% (в норме применения 60 г/га) и 100–100–91.7% (в норме применения 120 г/га) в течение 21 суток и в максимальной норме превышали аналогичные данные по эталонному препарату.

Аналогичные результаты были получены и в отношении весенней капустной мухи (табл. 5). Снижение поврежденности растений на протяжении 21 суток в норме применения 60 г/га составляло 100–76.7–76.2%; в норме применения 120 г/га – 100–100–91.7%, что превышало показатели эталонного препарата.

Учеты заселенности растений гусеницами капустной моли после обработки рассады инсектицидом изоцикloserам (табл. 6) также не показали существенного снижения числа гусениц, как и в случае с карбаматом Ланнат, СП (табл. 2), что объясняется, на наш взгляд, длительностью периода между обработкой растений и началом их заселения капустной молью. Тем не менее, различия в 1.1 гусеницы (при НСР₀₅ 1.4) между контролем и вариантом изоцикloserам в норме применения 120 г/га, в производственных условиях может иметь значение, поскольку в этом случае пороговые уровни (2 гусеницы на растение) не достигаются.

Таблица 3. Биологическая эффективность инсектицида Актара, ВДГ (250 г/кг) в борьбе с вредителями капусты белокочанной в рассадной технологии ее выращивания (Ленинградская обл., опытное поле ВИЗР, 2021 г.)

а) Крестоцветные блошки р. *Phyllotreta*

| Вариант обработки рассады | Норма применения препарата, кг/га | Среднее число имаго по суткам учетов после высадки рассады, экз./10 растений | | | | Снижение численности относительно контроля по суткам учетов после посадки, % | | | |
|--|-----------------------------------|--|------|------|------|--|-----|-----|------|
| | | 3 | 7 | 14 | 21 | 3 | 7 | 14 | 21 |
| Гибрид Конкэрон F₁ | | | | | | | | | |
| Актара, ВДГ (250 г/кг) | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 1.75 | 100 | 100 | 100 | 72.0 |
| Контроль | - | 6.0 | 9.25 | 9.25 | 6.25 | - | - | - | - |
| НСР₀₅ – не существенно | | | | | | | | | |
| Сорт Сторема | | | | | | | | | |
| Актара, ВДГ (250 г/кг) | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0.75 | 100 | 100 | 100 | 75.0 |
| Контроль | - | 7.0 | 11.0 | 10.0 | 3.0 | - | - | - | - |
| НСР₀₅ – не существенно | | | | | | | | | |

б) Весенняя капустная муха *Delia brassicae*

| Вариант обработки рассады | Норма применения препарата, кг/га | Среднее число поврежденных растений из 25 учтенных по суткам учетов после посадки | | | Снижение числа поврежденных растений относительно контроля по суткам учетов после посадки, % | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|---|------|-------------|--|-----|------|
| | | 7 | 14 | 21 | 7 | 14 | 21 |
| Гибрид Конкэрон F₁ | | | | | | | |
| Актара, ВДГ (250 г/кг) | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| Контроль | - | 1.0 | 3.5 | 5.75 | - | - | - |
| Сорт Сторема | | | | | | | |
| Актара, ВДГ (250 г/кг) | 0.3 | 0 | 0 | 0.75 | 100 | 100 | 87.3 |
| Контроль | - | 2.0 | 4.25 | 6.25 | - | - | - |
| НСР₀₅ | | | | | | | |
| | | - | - | 4.35 | - | - | - |

Table 3. Biological effectiveness of insecticide Actara, WDG (250 g/kg) against pests of white cabbage grown using seedling technology (Leningrad region, experimental field of All-Russian Institute of Plant Protection, 2021)**a) flea beetles of the genus of *Phyllotreta***

| Seedlings treatment | Formulation dosage, kg/ga | Average number of adults per 10 plants 3–21 days after planting | | | | Decrease in pest numbers compared to control 3–21 days after planting, % | | | |
|---|---------------------------|---|------|------|------|--|-----|-----|------|
| | | 3 | 7 | 14 | 21 | 3 | 7 | 14 | 21 |
| Hybrid Konkeron F ₁ | | | | | | | | | |
| Actara WDG (250 g/kg) | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 1.75 | 100 | 100 | 100 | 72.0 |
| Control | - | 6.0 | 9.25 | 9.25 | 6.25 | - | - | - | - |
| LSD₀₅ – no significance | | | | | | | | | |
| Variety Storema | | | | | | | | | |
| Actara WDG (250 g/kg) | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0.75 | 100 | 100 | 100 | 75.0 |
| Control | - | 7.0 | 11.0 | 10.0 | 3.0 | - | - | - | - |
| LSD₀₅ – no significance | | | | | | | | | |

b) cabbage root fly *Delia brassicae*

| Seedlings treatment | Formulation dosage, kg/ga | Average number of damaged plants per 25 plants 3–21 days after planting | | | Decrease in pest numbers compared to control 3–21 days after planting, % | | |
|--------------------------------|---------------------------|---|------|-------------|--|-----|------|
| | | 7 | 14 | 21 | 7 | 14 | 21 |
| Hybrid Konkeron F ₁ | | | | | | | |
| Actara WDG (250 g/kg) | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| Control | - | 1.0 | 3.5 | 5.75 | - | - | - |
| Variety Storema | | | | | | | |
| Actara WDG (250 g/kg) | 0.3 | 0 | 0 | 0.75 | 100 | 100 | 87.3 |
| Control | - | 2.0 | 4.25 | 6.25 | - | - | - |
| LSD₀₅ | | | | | | | |
| | | - | - | 4.35 | - | - | - |

Таблица 4. Биологическая эффективность инсектицида изоциклосерам в борьбе с крестоцветными блошками (р. *Phyllotreta*) на капусте белокочанной в рассадной технологии ее выращивания (Ленинградская обл., опытное поле ВИЗР, 2021 г., сорт Сторема)

| Вариант обработки рассады | Норма применения препарата | Среднее число имаго на 3–21 сутки после посадки, экз./10 растений | | | | Снижение численности относительно контроля на 3–21 сутки после посадки, % | | | |
|--|----------------------------|---|------|------|-----|---|------|------|------|
| | | 3 | 10 | 14 | 21 | 3 | 10 | 14 | 21 |
| Изоциклосерам (д.в.) | 60 г/га | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 2.0 | 59.6 | 72.7 | 70.0 | 41.7 |
| | 120 г/га | 0 | 0 | 0 | 0.2 | 100 | 100 | 100 | 91.7 |
| Акгара, ВДГ (250 г/кг) /эталон/ | 0.3 кг/га | 0 | 0 | 0 | 0.8 | 100 | 100 | 100 | 75.0 |
| Контроль | - | 7.0 | 11.0 | 10.0 | 3.0 | - | - | - | - |
| НСР₀₅ – не существенно | | | | | | | | | |

Table 4. Biological effectiveness of insecticide isocycloseram against flea beetles of the genus *Phyllotreta* on white cabbage grown using seedling technology (Leningrad region, experimental field of All-Russian Institute of Plant Protection, 2021, variety Storema)

| Seedlings treatment | Formulation dosage | Average number of adults per 10 plants 3–21 days after planting | | | | Decrease in pest numbers compared to control 3–21 days after planting, % | | | |
|---|--------------------|---|------|------|-----|--|------|------|------|
| | | 3 | 10 | 14 | 21 | 3 | 10 | 14 | 21 |
| Isocycloseram (act. comp.) | 60 g/ga | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 2.0 | 59.6 | 72.7 | 70.0 | 41.7 |
| | 120 g/ga | 0 | 0 | 0 | 0.2 | 100 | 100 | 100 | 91.7 |
| Actara WDG (250 g/kg) /standard | 0.3 kg/ga | 0 | 0 | 0 | 0.8 | 100 | 100 | 100 | 75.0 |
| Control | - | 7.0 | 11.0 | 10.0 | 3.0 | - | - | - | - |
| LSD₀₅ – not significant | | | | | | | | | |

Таблица 5. Биологическая эффективность инсектицида изоциклосерам в борьбе с весенней капустной мухой *Delia brassicae* на капусте белокочанной в рассадной технологии ее выращивания (Ленинградская обл., опытное поле ФГБНУ ВИЗР, 2021 г., сорт Сторема)

| Вариант обработки рассады | Норма применения препарата | Среднее число поврежденных растений из 25 учетных на 7–21 сутки после посадки | | | Снижение количества поврежденных растений относительно контроля на 7–21 сутки после посадки, % | | |
|---------------------------------|----------------------------|---|-------------|-------------|--|------|------|
| | | 7 | 14 | 21 | 7 | 14 | 21 |
| Изоциклосерам (д.в.) | 60 г/га | 0 | 1.0 | 1.5 | 100 | 76.7 | 76.2 |
| | 120 г/га | 0 | 0 | 0.5 | 100 | 100 | 92.1 |
| Актара, ВДГ (250 г/кг) /эталон/ | 0.3 кг/га | 0 | 0 | 0.8 | 100 | 100 | 87.3 |
| Контроль | - | 2.0 | 4.25 | 6.25 | - | - | - |
| | НСР₀₅ | | 1.9 | 2.76 | | | |

Table 5. Biological effectiveness of insecticide isocycloseram against cabbage root fly *Delia brassicae* on white cabbage grown using seedling technology (Leningrad region, experimental field of All-Russian Institute of Plant Protection, 2021, variety Storema)

| Seedlings treatment | Formulation dosage | Average number of damaged plants per 25 plants 7–21 days after planting | | | Decrease in pest numbers compared to control 7–21 days after planting, % | | |
|----------------------------------|-------------------------|---|-------------|-------------|--|------|------|
| | | 7 | 14 | 21 | 7 | 14 | 21 |
| Isocycloseram (act. comp.) | 60 g/ga | 0 | 1.0 | 1.5 | 100 | 76.7 | 76.2 |
| | 120 g/ga | 0 | 0 | 0.5 | 100 | 100 | 92.1 |
| Aktara WDG (250 g/kg) / standard | 0.3 kg/ga | 0 | 0 | 0.8 | 100 | 100 | 87.3 |
| Control | - | 2.0 | 4.25 | 6.25 | - | - | - |
| | LSD₀₅ | | 1.9 | 2.76 | | | |

Таблица 6. Влияние обработки рассады капусты белокочанной инсектицидами на заселенность растений гусеницами капустной моли (*Plutella xylostella*) (Ленинградская обл., опытное поле ВИЗР, 2021 г.)

| Вариант обработки рассады | Норма применения препарата | Среднее количество гусениц (экз./растение) | |
|--------------------------------|--|--|--------------|
| | | Гибрид Конкэрон F ₁ | Сорт Сторема |
| Изоциклосерам (д.в.) | 60 г/га | - | 1.4 |
| | 120 г/га | - | 1.2 |
| Актара, ВДГ(250 г/кг) /эталон/ | 0.3 кг/га | 1.8 | 2.3 |
| Контроль | - | 1.8 | 2.3 |
| | НСР₀₅ – не существенно | | |

Table 6. Impact of treating white cabbage seedlings with insecticides on plant infestation with diamondback moth *Plutella xylostella* larvae (Leningrad region, experimental field of All-Russian Institute of Plant Protection, 2021)

| Seedlings treatment | Formulation dosage | Average number of larvae (ex./plant) | |
|---------------------------------|---|--------------------------------------|-----------------|
| | | Hybrid Konkeron F ₁ | Variety Storema |
| Isocycloseram (act. comp.) | 60 g/ga | - | 1.4 |
| | 120 g/ga | - | 1.2 |
| Aktara WDG (250 g/kg) /standard | 0.3 kg/ha | 1.8 | 2.3 |
| Control | - | 1.8 | 2.3 |
| | LSD₀₅ – not significant | | |

Обсуждение

Первый период вегетации для капусты белокочанной наиболее опасный, каким бы способом ее не возделывали – молодые растения заселяются крестоцветными блошками и весенней капустной мухой, повреждения которой часто приводят к гибели растений (Асякин, 2015). Питание крестоцветных блошек в точке роста может привести к деформации в развитии, нарушая процессы формирования полноценного кочана. Существует два способа защиты

капусты белокочанной от этих вредителей (кроме использования устойчивых сортов): своевременный прогноз численности, позволяющий организовать обработку растений в поле инсектицидами, что, особенно, в случае весенней капустной мухи из-за растянутости лёта, достаточно проблематично. Другой способ – профилактическое обеззараживание семян и рассады, что стало возможным с появлением в арсенале средств защиты растений системных

инсектицидов класса неоникотиноидов. Проведение обеззараживания семян, если оно проводится вручную, а не механизировано на стационарах фирм-производителей семян, процедура трудоемкая и опасная: семена капусты очень мелкие, гладкие, рассчитать требуемую норму применения сложно. Тем не менее, в Республике Беларусь разработана система обеззараживания, основанная на использовании комбинированного препарата Престиж, КС, в состав которого входит инсектицид имидаклоприд из класса неоникотиноидов и фунгицид пенцикурон (Прищепина и др., 2008). Препарат разрешен для применения Государственным Каталогом Республики Беларусь (Волчкевич и др., 2021). В нашей стране для обработки семян капусты рекомендован комбинированный препарат Имидалит, ТПС, состоящий из двух инсектицидов: неоникотиноид имидаклоприд и пиретроид бифентрин («Государственный каталог...», 2021). Насколько препарат находит широкое применение в практике судить сложно, поскольку обработка семян в условиях хозяйств вручную затруднительна. Фирмы, производящие семена капусты, готовят их к посеву путем дражирования, обрабатывают микроэлементами, фунгицидом, некоторые и неоникотиноидами (Современное производство и техника. itex.com).

Однако в мире, в частности, в Европе, достаточно сложное отношение к использованию неоникотиноидов для обработки семян, в силу их высокой токсичности для пчел. Этот вопрос дискутируется и в настоящее время (Lundin et al., 2020). На наш взгляд, обработка семян представляет собой экологически более безопасный прием, чем обработка этими же препаратами непосредственно посадок в поле в ранневесенний период. Это подтверждается и имеющимися литературными данными по механизированной обработке тиаметоксамом клубней картофеля перед посадкой (Мартынушкин, Зенькевич, 2006; Сухорученко и др. 2008). В нашем случае применение неоникотиноида Актара, ВДГ для обработки рассады капусты белокочанной проводится с использованием поливочного устройства в условиях теплиц. Препарат в силу своих системных свойств поступает через корневую систему и за сутки после обработки концентрируется внутри растения, обеспечивая его иммунизацию и защиту после высадки в поле как от крестоцветных блошек, так и весенней капустной мухи. Это имеет большое значение для производства, поскольку сроки заселения растений весенней капустной мухой, как правило, растянуты, что затрудняет проведение своевременной обработки посадок инсектицидами в поле.

Заключение

Проведенные в 2019 и 2021 гг. исследования по проверке эффективности применения неоникотиноида Актара, ВДГ для обработки рассады капусты белокочанной, выращиваемой по кассетной технологии и широко используемой на Северо-Западе Российской Федерации более 15 лет, установили, что этот прием по-прежнему позволяет защищать культуру после высадки рассады в поле от ранневесенних вредителей: крестоцветных блошек

и весенней капустной мухи. В то же время, полученные результаты свидетельствуют о некотором уменьшении периода защитного действия. В этом плане очень важно расширение ассортимента средств за счет инсектицида нового химического класса изоксазолинов – изоциклосоерама, показавшего при обработке рассады высокую эффективность в защите капусты белокочанной от ранневесенних вредителей.

Библиографический список (References)

- Артемяева АМ, Зверева ОА, Кожанова ТН, Корнюхин ДЛ и др. (2016) Мобилизация овощных и бахчевых культур в XXI веке. *Труды ВИР по прикладной ботанике, генетике и селекции* 177 (2):6–21
- Асякин БП (2015) Биологическое обоснование защиты капусты белокочанной, возделываемой по безрассадной технологии, от комплекса вредных организмов. *Вестник защиты растений* 2(84):48–52
- Белых ЕБ, Иванова ГП, Дроздова ТН (2004) Совершенствование ассортимента инсектицидов на культуре капусты. Материалы международной научно-практической конференции «Химический метод защиты растений: Состояние и перспективы повышения экологической безопасности» СПб: 16–18
- Волчкевич ИД, Попов ФА, Романовский СИ (2021) Капуста белокочанная (болезни, вредители, сорняки и фитосанитарные мероприятия по ограничению их вредности) Приложение к журналу «Земледелие и Растениеводство» 5 (138) 28 с.
- Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Часть 1 (2021) М.: МСХ. 122 pp.
- Долженко ВИ, ред. (2009) Ассортимент химических средств защиты растений нового поколения (инсектициды, акарициды, моллюскоциды, родентициды). СПб.: ВИЗР. 80 с.
- Долженко ВИ, Буркова ЛА, Иванова ГП, Белых ЕБ (2008) Новые технологии применения современных инсектицидов для защиты овощных культур. В сб.: «Прогрессивные технологии применения химических средств защиты растений с целью предупреждения и ликвидации вредных организмов» СПб. 8–17
- Долженко ВИ, Иванова ГП, Белых ЕБ, Асякин БП (2009) Капустные мухи. Методические указания по регистрационным испытаниям инсектицидов, акарицидов, моллюскоцидов и родентицидов в сельском хозяйстве. СПб.: 200–202
- Иванова ГП, Белых ЕБ, Силаев АИ, Асякин БП (2009) Крестоцветные блошки. Методические указания по регистрационным испытаниям инсектицидов, акарицидов, моллюскоцидов и родентицидов в сельском хозяйстве. СПб.:191–194
- Мартынушкин АН, Зенькевич СВ (2006) Влияние обработок препаратами тиаметоксама на полезную энтомофауну и почвенную микрофауну картофельного агробиоценоза. *Вестник защиты растений* 3:35–42
- Минич АС, Минич ИБ, Райда ВС, Карначук РА и др. (2003) Биологическое тестирование светокорректирующих пленок в условиях закрытого грунта при выращивании белокочанной капусты. *Сельскохозяйственная биология* 3:112–115
- Петрушко ЮН, Потемкина ВИ, Федяй ВП (2003) Белокочанная капуста. Современная ресурсосберегающая

- технология выращивания в условиях Приморского края. Уссурийск. 76 с.
- Пивоваров ВФ, Бондарева ЛЛ, Шмыкова НА, Шумилина ДВ и др. (2017) Создание гибридов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L. *convar. capitata* var. *alba* DC) нового поколения с использованием линий удвоенных гаплоидов. *Сельскохозяйственная биология* 52 (1):143–151
- Прищепа ИА, Колядко НН, Попов ФА (2008) Сравнительная оценка эффективности защиты капусты белокочанной от вредных организмов при разных способах выращивания. *Земляробства і ахова раслін* 3(58):49–52
- Прищепа ИА, Волчкевич ИГ, Колядко НН, Попов ФА (2012) Изменение структуры доминирования вредных организмов в агроценозах капусты белокочанной при разных способах ее выращивания. *Земляробства і ахова раслін* 2(81):42–46
- Современное производство и техника. Капуста белокочанная. Технология выращивания капусты белокочанной в условиях малых форм хозяйствования https://itexn.com/8964_kapusta-belokochannaja-tehnologija-vyrashhivaniija-kapusty-belokochannoj-v-uslovijah-malyh-form-hozhajstvovaniija.html (06.04.2022)
- Сухорученко ГИ, Долженко ВИ, Васильева ТИ, Иванова ГП и др. (2008) Эффективная ресурсосберегающая технология применения препаратов тиаметоксама в борьбе с комплексом вредителей картофеля. Прогрессивные технологии применения химических средств защиты растений с целью предупреждения и ликвидации вредных организмов СПб.: ВИЗР. 25–33
- Beacham AM, Hand P, Barker GC, Denby KJ et al (2018) Addressing the threat of climate change to agriculture requires improving crop resilience to short-term abiotic stress. *Outlook Agric* 47(4):270–276
- Cassayre J, Smejkal T, Blythe J, Hoegger P et al (2021) The discovery of isocycloseram: A novel isoxazoline insecticide. In: *Recent Highlights in the Discovery and Optimization of Crop Protection Products*. pp. 165–212. Academic Press: Oxford.
- Cabirol A, Haase A (2019) The neurophysiological bases of the impact of neonicotinoid pesticides on the behaviour of honeybees. *Insects* 10(10):344. <https://doi.org/10.3390/insects10100344>
- Favela-González KM, Hernández-Almanza AY, De la Fuente-Salcido NM (2020) The value of bioactive compounds of cruciferous vegetables (*Brassica*) as antimicrobials and antioxidants: A review. *J Food Biochem* 44(10): e13414
- Giordano M, Petropoulos SA, Roupheal Y (2021) Response and defence mechanisms of vegetable crops against drought, heat and salinity stress. *Agriculture* 11(5): 463
- Kavita S, Narzary BD (2015) The effect of black polythene mulch on yield and quality of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) cv. green Express. *Trends Biosci* 8(11): 2795–2797
- Lundin O, Malsher G, Hogfeldt C, Bommarco R (2020) Pest management and yield in spring oilseed rape without neonicotinoid seed treatments. *Crop Protect* 137: 105261. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105261>
- Prasad R, Shivay YS (2017) Sulphur fertilization and food quality-A review. *Ind J Agron* 62(1): 1–7
- Ray LR, Alam MS, Junaid M, Ferdousy S et al (2021) Brassica oleracea var. capitata f. alba: A Review on its Botany, Traditional uses, Phytochemistry and Pharmacological Activities. *Mini Rev Med Chem* 21(16): 2399–2417
- Uuh-Narvaez JJ, Segura-Campos MR (2021) Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*): A food with functional properties aimed to type 2 diabetes prevention and management. *J Food Sci* 86(11): 4775–4798
- Warwick SI (2011) Brassicaceae in agriculture. In: Schmidt R, Bancroft I (eds) *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*. Springer: New York. 33–65
- Zhang Q, Zhao C, Lu X, Yu B et al (2020) Advances in research on toxic effects of neonicotinoid insecticides on non-target organisms. *Asian J Ecotoxicol* 1:56–71. <https://doi.org/10.7524/AJE.1673-5897.20190328001>

Translation of Russian References

- Artemyeva AM, Zvereva OA, Kozhanova TN, Kornukhin DL et al. (2016) Mobilization of vegetable and melon crops in the 21st century. *VIR Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding* 177 (2): 6–21 (In Russian)
- Asyakin BP (2015) Biological grounds of protection of cabbage cultivated by non-seedling technology from complex of pest organisms. *Plant Prot News* 2(84): 48–52 (In Russian)
- Belykh EB, Ivanova GP, Drozdova TN (2004) Improving the range of insecticides on cabbage culture. Proc. Internat. Sci.-Pract. Conf. “Chemical method of plant protection: Status and prospects for improving environmental safety”. St. Petersburg: 16–18 (In Russian)
- Dolzhenko VI, Burkova LA, Ivanova GP, Belykh EB (2008) New technologies for the use of modern insecticides for the protection of vegetable crops. In: “Progressive technologies for the use of chemical plant protection products to prevent and eliminate harmful organisms” St. Petersburg. 8–17 (In Russian)
- Dolzhenko VI, Ivanova GP, Belykh EB, Asyakin BP (2009) Cabbage flies. Guidelines for registration testing of insecticides, acaricides, molluscicides and rodenticides in agriculture. St. Petersburg: 200–202 (In Russian)
- Dolzhenko VI, ed (2009) [Guides for registration trials of insecticides, acaricides, molluscicides and rodenticides in agriculture]. St. Petersburg: VIZR. 322 p. (In Russian)
- Ivanova GP, Belykh EB, Silaev AI, Asyakin BP (2009) Cruciferous fleas. Guidelines for registration testing of insecticides, acaricides, molluscicides and rodenticides in agriculture. St. Petersburg: 191–194 (In Russian)
- Martynushkin AN, Zenkevich SV (2006) Influence of treatments with thiamethoxam preparations on useful entomofauna and soil microfauna of potato agrobiocenosis. *Crop Protection Herald* 3:35–42 (In Russian)
- Minich AS, Minich IB, Raida VS, Karnachuk RA et al (2003) Biological testing of light-correcting films under greenhouse conditions in white cabbage cultivation. *Agricultural Biology* 3: 112–115 (In Russian)
- Petrushko Yun, Potemkina VI, Feday VP (2003) White cabbage. Modern resource-saving technology of cultivation in the conditions of Primorsky Krai. Ussuriysk. 76 p. (In Russian)

- Pivovarov VF, Bondareva LL, Shmykova NA, Shumilina DV et al. (2017) Creation of hybrids of white cabbage (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *alba* DC) of a new generation using lines of doubled haploids. *Agricultural Biology* 52(1): 143–151 (In Russian)
- Prishchepa IA, Kolyadko NN, Popov FA (2008) Comparative evaluation of the effectiveness of the protection of white cabbage from harmful organisms with different methods of growing. *Zemlyarobstva i akhova raslin* 3(58): 49–52 (In Russian)
- Prishchepa IA, Volchkevich IG, Kolyadko NN, Popov FA (2012) Changes in the structure of pest dominance in cabbage agrocenoses under different methods of its cultivation. *Zemlyarobstva i akhova raslin* 2(81): 42–46 (In Russian)
- Modern production and technology. White cabbage. Technology for growing white cabbage in small farms https://itexn.com/8964_kapusta-belokochannaja-tehnologija-vyrashhivaniya-kapusty-belokochannoj-v-uslovijah-malyh-form-hozjajstvovaniya.html (21.03.2022) (In Russian)
- State Catalogue of Pesticides and Agrochemicals Permitted for Use on the Territory of the Russian Federation. Part 1. (2021) M.: MSKH. 122 pp. (In Russian)
- Stirmanov AV, Gallyamova OV. Thiametoxam (Aktara). https://www.pesticity.ru/active_substance/thiametoxam (06.04.2022)
- Sukhoruchenko GI, Dolzhenko VI, Vasilyeva TI, Ivanova GP et al (2008) [Effective resource-saving technology for the use of thiamethoxam preparations in the fight against a complex of potato pests]. In: [Progressive technologies for the use of chemical plant protection products to prevent and eliminate harmful organisms]. SPb.: VIZR. 25–33 (In Russian)
- Volchkevich ID, Popov FA, Romanovsky SI (2021) White cabbage (diseases, pests, weeds and phytosanitary measures to limit their harmfulness). Appendix to the journal “Agriculture and Crop Production” 5(138). 28 p. (In Russian)

Plant Protection News, 2022, 105(1), p. 40–49

OECD+WoS: 4.01+AM (Agronomy)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-1-15236>

Full-text article

EFFECTIVENESS OF INSECTICIDES AGAINST PESTS OF WHITE CABBAGE GROWN USING SEEDLING TECHNOLOGY

P.A. Opyakin, G.P. Ivanova*

All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

*corresponding author, e-mail: galinaivanova-vizr@yandex.ru

Among the two methods of growing white cabbage, the seedling technology is more widely used in North-Western Russia. Watering seedlings in cassettes with a systemic formulation of neonicotinoid insecticide Actara, WDG (250 g/kg thiamethoxam) prior to planting has been developed to protect white cabbage from early spring pests: flea beetles of the genus of *Phyllotreta* and the cabbage root fly. This approach is widely used by commercial growers and its efficacy requires monitoring under current conditions because of a possibility of resistance development. Testing Actara, WDG in 2019 and 2021 at the experimental field of All-Russian Institute of Plant Protection didn't show any significant decrease of biological effectiveness of seedling treatment. Testing biological effectiveness of systemic insecticides belonging to the chemical class of carbamates Lannate, WSP (250 g/kg metomil) and the new class isoxazolines isocycloseram was carried out in parallel. Biological effectiveness of the latter insecticide was higher compared to Actara against the flea beetles and the cabbage root fly during a 21-day period. In addition, plant infestation with diamondback moth decreased. Efficacy indices of Lannate were significantly lower. Isocycloseram shows a good potential for inclusion into the Index of Registered Formulations of the Russian Federation to protect cabbage against a complex of insect pests. Having an additional active ingredient available to farmers will be beneficial for developing rotation schemes to combat pest resistance.

Keywords: seedlings, flea beetles, cabbage root fly, diamondback moth, neonicotinoids, carbamates, isoxazolines, biological effectiveness

Submitted: 10.02.2022

Accepted: 05.04.2022

MOLECULAR DETECTION OF ENDOSYMBIONTS IN LOCAL POPULATIONS OF *HELICOVERPA ARMIGERA* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) IN EUROPEAN PART OF RUSSIA

A.G. Kononchuk*, S.M. Malysh, A.S. Rumiantseva, D.S. Kireeva, A.V. Gerus, V.S. Zhuravlyov

All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

**corresponding author, e-mail: akononchuk@vizr.spb.ru*

Cotton bollworm *Helicoverpa armigera* is one of the most polyphagous and cosmopolitan pests. Intracellular endosymbionts are widespread in Lepidoptera, often playing an important role in their dynamics. The prevalence of endosymbionts of cotton bollworm in Russia was not investigated. Cotton bollworm larvae and adults were collected in 2018–2020 in Krasnodar Area, and in Voronezh and Saratov Regions (from 131 to 170 insects) and analyzed by PCR using sets of group-specific primers for baculoviruses (locus *lef8*), bacteria of the genus of *Wolbachia* (locus *wsp*), and microsporidia (locus SSU rRNA). Level of infection with baculoviruses was 16% for the sample of 32 individuals collected in Temryuk District of Krasnodar Area in 2018. The infection rate of the entire sample of 170 individuals was 2.9%. The *lef8* locus demonstrated 98.7–99.6% of sequence similarity to the nuclear polyhedrosis virus isolates from the cotton bollworm and American bollworm. Among the tested 131 insects, bacteria of the genus of *Wolbachia* were not detected. PCR screening for microsporidia revealed one positive larvae among 19 insects collected in Krasnoarmeysk District of Krasnodar Area in 2019, which corresponded to the prevalence of 5%. Partial sequencing of the genes coding for SSU rRNA and largest subunit RNA polymerase II made it possible to identify the new isolate as *N. bombycis*.

Keywords: obligate intracellular parasites, entomopathogenic microorganisms, pests lepidoptera, natural infection, nuclear polyhedrosis virus, Microsporidia, *Wolbachia*, *Nosema bombycis*

Submitted: 10.02.2022

Accepted: 07.04.2022

Introduction

Cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Noctuoidea: Noctuidae) is among the most polyphagous and cosmopolitan pests (Cunningham, Zalucki 2014; Gomes et al., 2017). This is a multivoltine species characterized by high ecological plasticity, which allows the insect to adapt easily to changing environmental conditions and reach a high abundance (Chenkin et al., 1990; Farrow, Daly, 1987; Jones et al., 2018). The cotton bollworm is one of the most dangerous agricultural pests in Russia and other countries of Europe, Asia, Africa, Australia etc. (Fitt, 1989; Tay et al., 2013; Arnemann et al., 2016; Murúa et al., 2014; Czepak et al., 2013). According to different sources, the number of plant species damaged by this pest ranges between 120 and 180 species (Singh et al., 2002; Wu et al., 2008; Murúa et al., 2014). The most preferred crops are cotton, tomatoes, cereals, such as corn and sorghum, as well as soybean, chickpea and other legumes (Riaz et al., 2021). The annual global cost of controlling this pest, together with crop losses, is estimated at US\$5 billion (Murúa et al., 2014; Haile et al., 2021). Intensive and sometimes unreasonable use of broad-spectrum synthetic pesticides reduces the effectiveness of natural enemies and biocontrol agents, while the target pest species develop resistance to a wide range of insecticides (Armes et al., 1996; Ahmed et al., 2004; Yang et al., 2013). Solving these problems requires improvement of the synthetic pesticides range and their rational use to preserve the natural enemies of *H. armigera* in different agroecosystems (Mohan et al., 2008; Williams et al., 2022), as well as development of alternative, environmentally friendly approaches to population management (Binod et al., 2007; Yu et al., 2008; Patil, Jadhav, 2015; Suryanarayanan et al., 2016; Knox et al., 2016; Kolosov et al., 2017; Agasieva et al., 2019). To understand the main patterns of population dynamics, improve forecasting systems

and identify new forms of potential sources of microbiological formulations, it is necessary to perform screening of the pest populations aimed at identification of pathogenic microorganisms of the main groups.

Among the obligate intracellular symbionts, which are the most widespread and frequently found in insects, three groups deserve attention in the first place.

The first group includes the nuclear polyhedrosis (NPV) and granulosis viruses from the Baculoviridae family of double-stranded DNA viruses that infect insects from the orders of Lepidoptera, Hymenoptera, and Diptera (Van Regenmortel et al., 2000). They serve as the basis of microbial formulations against Lepidoptera pests, including the cotton bollworm, which are widely used worldwide (Chen et al., 2000; Shapiro et al., 2002; Yu et al., 2015; Kolosov et al., 2017; Eroglu et al., 2019). NPV populations can grow rapidly, increasing its number at billion-fold rate per insect. Up to three such viral “generations” can be multiplied in one generation of insects (Harper, 1987), which provides in vivo large-scale propagation of baculoviruses and makes them the promising agents for biological plant protection (Eroglu et al., 2018). Despite the isolation of numerous NPV strains from the cotton bollworm in various parts of the world and studies of their genetic polymorphism and effectiveness in terms of combating this pest (Leslie Hayes, Bell, 1994; Moscardi, 1999; Erlandson, 2009; Baillie, Bouwer, 2012; Arrizubieta et al., 2014; Ardisson-Araújo et al., 2015), assessment of natural prevalence levels is usually not carried out. Specific data on the levels of natural infection of cotton bollworm populations are missing. For other members of the Noctuidae family, there are data on the prevalence of nuclear polyhedrosis virus for *Spodoptera frugiperda* in Louisiana, where the virus prevalence ranged

from 50 to 68%, being higher than that of the other pathogens (Fuxa, 1982). In other works, the level of occurrence of NPV in lepidopteran was estimated after artificial introductions of viral particles, which did not allow estimating the natural prevalence rates (Fuxa and Richter, 1999; Cherry et al., 2000).

The second group, bacteria of the genus *Wolbachia*, belong to widespread endosymbionts of arthropods (Bouchon et al., 1998), and infect according to various estimates, from 40 to 65% of the arthropod species (Hilgenboecker et al., 2008; Werren et al., 2008; Zug, Hammerstein 2012). The effects of *Wolbachia* on insects including Lepidoptera, are very diverse (Hiroki et al., 2004; Charlat et al., 2006, 2007; Narita et al., 2007; Graham, Wilson, 2012; Salunkhe et al., 2014; Arai et al., 2019), and the study of these bacteria is of interest both from theoretical and practical points of view. The prevalence of *Wolbachia* in lepidopteran populations varies from almost complete absence to 100% infection (Tagami, Miura, 2004; Salunke et al., 2012; Ahmed et al., 2015; Solovyev et al., 2015; Ilinsky, Kosterin, 2017; Tokarev et al., 2017; Bykov et al., 2020). For example, in *Dendrolimus superans*, a high level of infection with *Wolbachia* (69–100%) has been shown to be maintained in geographically distant populations for several years (Bykov et al., 2020). For *Aporia crataegi*, the frequency of *Wolbachia* occurrence was very low: out of 376 samples collected in 10 regions of Russia, only eight *Wolbachia*-positive insects were found in Yakutia, Buryatia, Sverdlovsk and Kaliningrad Regions (Bykov et al., 2021). In *Loxostege sticticalis*, the prevalence of *Wolbachia* varied from 21 to 40% in Asian and from 0 to 47% in European parts of Russia (Malysh et al., 2020). Analysis of the sample of 257 individuals for the presence of *Wolbachia* in *Hypolimnas bolina* females collected from the wild habitat showed that 99% of the females were infected (Dyson, Hurst, 2004). The presence of endosymbiotic bacteria of the genus of *Wolbachia* was also found in populations of stem borers of the genus *Ostrinia*. In various geographic populations, endosymbiont prevalence ranged from 2.9 (N=34) to 65.8% (N=38), with three of the four habitats showing a significantly higher level of infection for *O. scapularis* as compared to *O. nubilalis* (Tokarev et al., 2017). *Pieris rapae* in Japan was infected with *Wolbachia* with the prevalence of 0–3% (Tagami, Miura, 2004). In addition, in the Japanese populations of the gypsy moth (*Lymantria dispar japonica* and *L. postalba*), the presence of *Wolbachia* was not revealed (Ilinsky et al., 2017).

The third group is the microsporidia, parasitic protists related to fungi. They parasitize the representatives of all

major taxa of Animalia kingdom, including higher vertebrates and humans (Issi, 2020). The largest number of microsporidia was found in arthropods (Wittner, 1999), and many species are highly pathogenic to these hosts and significantly affect their populations. Interest in the study of microsporidia has notably increased recently due to the understanding of their role as dangerous pathogens of humans and economically significant species of vertebrates and invertebrates. They are also widely exploited as a model of intracellular parasites demonstrating the maximum level of genome and cell minimization (Wittner, 1999; Becnel, Andreadis, 2014). The role of infection with microsporidia in the host density dynamics has been studied well for several lepidopterans (Issi, 1986; Frolov et al., 2008; Lipa, Madziara-Borusiewicz, 1976; Zelinskaya, 1980; Solter et al., 1997; 2010; Van Frankenhuyzen et al., 2007; Kermani et al., 2013; Simoes et al., 2015; Hopper et al., 2016; Malysh et al., 2021). In particular, in the stem borers of the genus of *Ostrinia*, the levels of microsporidia infection in Russia ranged from 3.0 to 17.2% in 2005–2010 (Malysh et al., 2011) and from 0 to 16% in 2011–2016 (Grushevaya et al., 2018). PCR analysis of 98 individuals of *L. sticticalis* for the presence of microsporidia was positive for 7% of the samples (Malysh et al., 2019). The prevalence of microsporidiosis in *Bombyx mori* in India was about 15–20% (Bhat et al., 2009). In *Archips xylosteana* in Bulgaria, the prevalence of microsporidiosis was 3% for the sample of 791 individuals (Pilarska, 2017). In Japanese populations of *Lymantria* spp., microsporidia infection was not detected (Ilinsky et al., 2017), although they are known in European and North American populations (McManus, Solter, 2003). In the susceptibility bioassays of the cotton bollworm, isolates of microsporidia from different hosts were exploited. However, when spotting microsporidia infections of the cotton bollworm under natural conditions, the frequency data were not indicated (Issi, Nilova, 1967; Gaugler, Brooks, 1975; Lee, Anstee, 1992; Mitchell, Cali, 1994; Rabindra, Jayaraj, 1994; Pei et al., 2021).

Studies of natural infections by viruses and microorganisms in populations of this pest in the Former Soviet Union Countries in the 21st century are restricted to the detection of new isolates of baculoviruses, most of which were done using laboratory-maintained insect cultures of Central Asian origin (Kolosov et al., 2017). The aim of this work was to assess the natural occurrence of baculoviruses, *Wolbachia* spp. and microsporidia in local populations of the cotton bollworm in the European part of Russia using molecular markers.

Materials and methods

To detect the presence of entomopathogens in cotton bollworm populations, *H. armigera* larvae were collected in maize stands in five localities of Krasnodar Area, Voronezh and Saratov Regions, and adults were caught on the pheromone trap at one point, Gulkevichi Region of Krasnodar Area in 2019 (Fig. 1). The total amount of collected material was 170 individuals. Insects were stored either dry at room temperature without preservatives or in 90% ethanol. Total DNA was extracted using a simplified protocol of Sambrook et al. (1989) without addition of phenol, with adjustments in the volumes of DNA washing agents (Malysh et al., 2019). Samples were homogenized in 100 µl of CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide). Then, 500 µl of CTAB + β-mercaptoethanol (final

concentration 0.2%) were added and incubated at a +65 °C for 2 hours, consequently washed with a mixture of chloroform and isoamyl alcohol (24:1), precipitated with ethanol and resuspended in 50 µl of ultra-purified water. The DNA solution was used for PCR analysis. The PCR mix consisted of 4 µl of DNA, 5 µl of DreamTaq Green PCR Master Mix, and 0.5 µl of primers (forward and reverse). For the analysis, only half of each individual sample was used, saving the other half for further analysis in case the microsporidia spores are detected.

The DNA quality of individual samples was checked by PCR with LepF1:LepR1 primers flanking the Metazoa mitochondrial DNA fragment (Hebert et al., 2004). Testing for the presence of *Wolbachia*, as well as baculoviral

and microsporidian infections, was carried out by PCR amplification with the following primer sets (Table 1):

- to determine the presence of baculoviruses, primers L8F2:L8R2 were used, flanking the conservative region of the late elongation factor gene (*lef8*). As a reference (positive control), we used DNA samples of the cotton bollworm nuclear polyhedrosis virus, isolate HS-18 (kindly provided by Kolosov A.V., FBSI SRC VB “Vector” of Rospotrebnadzor);

- to determine the presence of microsporidia, standard primers 18f:1047r were used, to amplify part of the small subunit rRNA gene (SSU rRNA). The positive control was

the DNA sample of microsporidia *Nosema pyrausta* from the corn borer (kindly provided by I.V. Grushevaya, All-Russian Institute of Plant Protection). For more accurate identification, primers nvRPb f1 were used: nvRPB r1 to the gene fragment of the large subunit of RNA polymerase II (*rpb1*);

- the analyses for the presence of *Wolbachia*, were carried out by amplification with the wsp81F:wsp691 primer set specific for the *Wolbachia* surface protein (*wsp*) locus. *Wolbachia* DNA samples from the corn borer (kindly provided by I.V. Grushevaya) were used as a positive control.

Table 1. Primers used for detection of endosymbionts of cotton bollworm *Helicoverpa armigera*

Таблица 1. Праймеры, используемые для диагностики эндосимбионтов хлопковой совки *Helicoverpa armigera*

| Primer name Название праймера | 5'-3' Primer sequence 5'-3' последовательность праймера | Target, amplicon size Цель, размер ампли- кона | Reference Ссылка |
|-------------------------------------|--|--|-------------------------|
| L8F2 | GTAAAACGACGGCCAGTNNNACNRCNGARGAYCC | <i>Baculovirus</i> late elongation factor, ~500 bp | Herniou et al., 2004 |
| L8R2 | AACAGCTATGACCATGMMNCCYTTYTGNCRTG | | Herniou et al., 2004 |
| wsp 81F | TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC | <i>Wolbachia</i> surface protein, ~600 bp | Zhou et al., 1998 |
| wsp 691R | AAAAATTAAACGCTACTCCA | | Zhou et al., 1998 |
| 18f | GTTGATTCTGCCTGACG | Microsporidia small subunit rRNA, ~900 bp | Weiss, Vossbrinck, 1999 |
| 1047r | AACGCCATGCACAC | | Weiss, Vossbrinck, 1999 |
| nvRPB1F1 | CCWATGTTYCATGTYYGGTTA' | RNA polymerase II largest subunit, ~700 bp | Tokarev et al., 2019 |
| nvRPB1R1 | TAATTACAGACCTGGCACT | | |

The amplification program was the same for all primers: initial denaturation at 95 °C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 54 °C for 1 min, elongation at 72 °C for 1 min, and final elongation step of 72 °C for 5 min.

The amplicons were visualized using electrophoresis in 1% agarose gels with GeneRuler Ladder Mix molecular weight marker, 75–20000 bp (Thermo Fisher Scientific). Amplicons in the gel of about 500 bp (primers L8F2:L8R2), 600 bp (wsp81F:wsp691), 900 bp (18f:1047r) and 700 bp (nvRPB1F1:nvRPB1R1) were excised with a scalpel and frozen until further purification. The cut sections of the gel were melted in a 3 M solution of guanidine isothiocyanate, and the amplicons were purified by the silica sorption method (Vogelstein, Gillepsie, 1979). The purified amplicons were sequenced at the Core Centrum «Genomic Technologies,

Proteomics and Cell Biology» of the All-Russian Institute of Agricultural Microbiology in both directions by a standard method of chain termination (Sanger et al., 1977) using an ABI Prism 3500 genetic analyzer. The obtained sequencing chromatograms were analyzed using the BioEdit software (Hall, 1999). The search for homologous sequences in GenBank was performed on the NCBI server using the built-in BLAST utility using the megablast and blast algorithms (Altschul et al., 1990).

To compare the morphometric characteristics of microsporidian spores, the length and width of at least 10 spores of the new isolate from the cotton bollworm were measured, and compared to the *N. bombycis* spores from the silkworm culture at the Research Institute of Sericulture (Tashkent, Uzbekistan), kindly provided by I.V. Senderskiy (All-Russian Institute of Plant Protection).

Results

The quality of DNA samples was confirmed by amplification of the DNA fragment of insects with primers LepF1:LepR1. In the most of samples, no positive signals or nonspecific reactions with non-target DNA were observed while diagnosing endosymbionts with corresponding primers. However, a few sequences of amplicons of the expected size amplified with baculovirus- and *Wolbachia*-specific primers, matched DNA fragments of the host insect or intestinal bacteria and were excluded from the study.

In particular, a number of amplicons positive reaction for baculoviruses was registered in 5 out of 32 samples from one sample of Temryuk District of Krasnodar Area in 2018. This corresponds to 16% prevalence, and to 2.9% if to consider the entire sample of 170 tested insects (Table 2).

Amplified fragments of the *lef8* gene were sequenced. The obtained sequences demonstrated high levels of identity

with homologous regions of genomes of numerous viral isolates designated in GenBank as cotton bollworm nuclear polyhedrosis viruses (NPVs) (*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, HearNPV) or the American cotton bollworm NPVs (*Helicoverpa zea* nucleopolyhedrovirus, HzNPV). Both isolates derive from various representatives of closely related species of the *Heliothis/Helicoverpa* complex, and from *Hyblea puera* (Hyblaeoidea: Hyblaeidae). Alignment of 380 nucleotides showed 100% identity of HS-18 strain used as standard in this study (1) with the corresponding fragment of the whole genome sequence deposited earlier for this strain in GenBank (accession # KJ004000) and (2) with some other HzNPV isolates (# KM596835) and (4) HearNPV (# KU738904 and # KJ922128). Isolates from Temryuk identified in this work contained two A/G transitions, one of which was not found in other isolates (Table 3). The similarity of



Figure 1. Sampling sites of *Helicoverpa armigera* larvae and adults in Temryuk (1), Slavyansk (2), Krasnoarmeysk (3), and Gulkevichi Districts (4) of Krasnodar Area, Ramon District of Voronezh Region (5), Engels District of Saratov Region (6)

Рисунок 1. Места отборов проб гусениц и имаго *Helicoverpa armigera* в Темрюкском (1), Славянском (2), Красноармейском (3) и Гулькевичском (4) районах Краснодарского края, Рамонском районе Воронежской области (5) и Энгельском районе Саратовской области (6)

the Temryuk isolates to the HzNPV and HearNPV sequences from GenBank, was 98.7–99.6% (Table 4). To understand the genetic differentiation of HzNPV and HearNPV at the genome level, a BLAST analysis of the whole genome sequence of HS-18 was additionally performed, which showed a similarity of >99.9% with HzNPV and >99.6% with HearNPV (Table 5).

For assessing the prevalence of bacteria of the genus *Wolbachia*, 131 individual DNA samples were tested. All of them produced a positive reaction with primers LepF1: LepR1 demonstrating thus suitability of the samples for PCR amplification. None of these samples produced a specific signal with *Wolbachia*-specific primers that could be confirmed by sequencing. At the same time, a sample of genomic DNA of a

Wolbachia-infected corn borer, used as a positive control, gave a signal of the expected size in all the experiments performed. Thus we consider the negative result of *Wolbachia* detection in bollworm samples as reliable.

PCR screening for microsporidia revealed one positive signal for the sample from Krasnoarmeysk District of Krasnodar Area, obtained in 2019. Prevalence level in this sample equaled to 5.2% (N=19), and for the whole dataset of 168 individuals – to 0.6%. Sequencing the SSU rRNA gene fragment showed 100% identity to the microsporidium *N. bombycis* from the silkworm *B. mori*, as well as to numerous unidentified isolates from lepidopterans belonging to different families (Table 6). The *rpb1* sequence, deposited in GenBank

Table 2. Size of analyzed samples from local populations of the cotton bollworm

| Sampling site | Year | Stage | Number of analyzed samples* (N) | | |
|--|------|---------------------|---------------------------------|---------------|------------------|
| | | | baculoviruses | microsporidia | <i>Wolbachia</i> |
| Krasnodar Area, Temryuk District | 2018 | larvae | 32(5) | 32 | 32 |
| Krasnodar Area, Slavyansk District | 2018 | larvae | 30 | 30 | - |
| | 2020 | larvae | 9 | - | - |
| Krasnodar Area, Gulkevichi District | 2019 | adults (from traps) | 30 | 30 | 30 |
| Krasnodar Area, Krasnoarmeysk District | 2019 | larvae | 12 | 19(1) | 12 |
| Voronezh Region, Ramon District | 2019 | larvae | 29 | 29 | 29 |
| Saratov Region, Engels District | 2020 | larvae | 28 | 28 | 28 |
| TOTAL | | | 170(5) | 168(1) | 131(0) |

* in brackets is the number of verified positive samples (if any).

Таблица 2. Объем проанализированных выборок локальных популяций хлопковой совки

| Место сбора | Год сбора | Стадия развития | Объем выборки* при анализе на | | |
|---|-----------|--------------------|-------------------------------|---------------|-----------|
| | | | бакуловирусы | микроспориций | вольбахию |
| Краснодарский край, Темрюкский район | 2018 | Гусеницы | 32(5) | 32 | 32 |
| Краснодарский край, Славянский район | 2018 | Гусеницы | 30 | 30 | - |
| | 2020 | Гусеницы | 9 | - | - |
| Краснодарский край, Гулькевичский район | 2019 | Имаго (из ловушек) | 30 | 30 | 30 |
| Краснодарский край, Красноармейский район | 2019 | Гусеницы | 12 | 19(1) | 12 |
| Воронежская область, Рамонский район | 2019 | Гусеницы | 29 | 29 | 29 |
| Саратовская область, Энгельский район | 2020 | Гусеницы | 28 | 28 | 28 |
| ИТОГО | | | 170(5) | 168(1) | 131(0) |

* в скобках указано количество верифицированных положительных проб (при наличии).

Table 3. Polymorphism of the nucleotide sequences of the *lef8* gene fragment of the *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus isolates obtained in the present study from Krasnodar Area (TEMRYUK21...32) and standard strain HS-18 (VECTOR), as well as those accessible through GenBank (annotated with accession number and host species)

Таблица 3. Полиморфизм нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *lef8* вируса ядерного полиэдроза хлопковой совки, полученных в настоящей работе для изолятов из Краснодарского края (TEMRYUK21...32) и эталонного штамма ХС-18 (VECTOR), а также доступных в GenBank (указан номер доступа и вид насекомого-хозяина)

| GenBank Accession # or strain name Номер доступа в GenBank или название изолята | Host species Вид хозяина | Nucleotide position as in reference sequence KJ004000* Положение нуклеотида относительно референсного сиквенса KJ004000* | | | | | | | | |
|--|-----------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 32305 | 32308 | 32387 | 32389 | 32419 | 32488 | 32509 | 32524 | 32602 |
| KJ004000 (HS-18) | <i>Helicoverpa zea</i> | C | G | T | A | G | T | G | C | G |
| VECTOR (HS-18 in this study) | <i>Helicoverpa armigera</i> | C | G | T | A | G | T | G | C | G |
| TEMRYUK21 | <i>Helicoverpa armigera</i> | C | A | T | G | G | T | G | C | G |
| TEMRYUK24 | <i>Helicoverpa armigera</i> | C | A | T | G | G | T | G | C | G |
| TEMRYUK32 | <i>Helicoverpa armigera</i> | C | A | T | G | G | T | G | C | G |
| KU738904 | <i>Helicoverpa</i> | C | G | T | A | G | T | G | C | G |
| KM596835 | <i>Helicoverpa zea</i> | C | G | T | A | G | T | G | C | G |
| KJ922128 | <i>Helicoverpa armigera</i> | C | G | T | A | G | T | G | C | G |
| KM357512 | <i>Helicoverpa armigera</i> | C | G | T | G | G | T | G | C | G |
| AY118080 | <i>Helicoverpa armigera</i> | C | G | T | G | G | T | A | C | G |
| KT013224 | <i>Helicoverpa armigera</i> | C | G | T | G | A | T | G | C | G |
| KJ701031 | <i>Helicoverpa armigera</i> | C | G | T | G | G | T | G | C | G |
| MK507817 | <i>Helicoverpa armigera</i> | T | G | T | G | G | T | G | T | A |
| MG569706 | <i>Helicoverpa assulta</i> | C | G | A | G | G | C | A | T | G |
| MT810812 | <i>Helicoverpa armigera</i> | C | G | A | G | G | C | A | C | G |
| MH254887 | <i>Hyblaea puera</i> | C | G | T | G | A | T | G | C | G |

*The unique polymorphic position of the newly found baculovirus variants is highlighted with gray background.

*Уникальная полиморфная позиция вновь найденных вариантов бакуловируса отмечена серым фоном.

Table 4. The nucleotide sequences of the *lef8* gene of isolates of the *Helicoverpa armigera* nuclear polyhedrosis virus available in GenBank, used for comparative analysis in this work

| Species, isolate | Host | Country | GenBank Accession # | Start position | End position | Identity level, % |
|--|-----------------------------|--------------|---------------------|----------------|--------------|-------------------|
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa armigera</i> | Spain | KJ701031 | 32242 | 32630 | 99.23 |
| <i>Helicoverpa</i> SNPV AC53 | <i>Helicoverpa</i> sp. | Australia | KU738904 | 32173 | 32561 | 98.97 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa armigera</i> | India | KT013224 | 14454 | 14842 | 98.97 |
| <i>Helicoverpa zea</i> single nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa armigera</i> | Brazil | KM596835 | 31027 | 31415 | 98.97 |
| <i>Helicoverpa zea</i> single nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa zea</i> | Uzbekistan* | KJ004000 | 32226 | 32614 | 98.97 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa armigera</i> | India | KM357512 | 1895 | 2283 | 99.23 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> SNPV | <i>Helicoverpa armigera</i> | Australia | KJ922128 | 32207 | 32595 | 98.97 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa armigera</i> | South Africa | AY118080 | 460 | 848 | 98.97 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Heliothis peltigera</i> | Turkey | MK507817 | 32100 | 32488 | 98.46 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa armigera</i> | China | MT810812 | 32536 | 32924 | 98.46 |
| <i>Helicoverpa assulta</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa assulta</i> | China | MG569706 | 32470 | 32858 | 98.20 |
| <i>Hyblaea puera</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Hyblaea puera</i> | India | MH254887 | 29 | 341 | 98.72 |

* according to Kolosov A.V., personal communication.

Таблица 4. Доступные в GenBank нуклеотидные последовательности гена *lef8* изолятов вируса ядерного полиэдроза *Helicoverpa armigera*, использованные для сравнительного анализа в настоящей работе

| Вид, изолят | Хозяин | Страна | Номер доступа в GenBank | Начальная позиция | Конечная позиция | Уровень сходства, % |
|--|-----------------------------|--------------|-------------------------|-------------------|------------------|---------------------|
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa armigera</i> | Испания | KJ701031 | 32242 | 32630 | 99.23 |
| <i>Helicoverpa</i> SNPV AC53 | <i>Helicoverpa</i> sp. | Австралия | KU738904 | 32173 | 32561 | 98.97 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa armigera</i> | Индия | KT013224 | 14454 | 14842 | 98.97 |
| <i>Helicoverpa zea</i> single nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa armigera</i> | Бразилия | KM596835 | 31027 | 31415 | 98.97 |
| <i>Helicoverpa zea</i> single nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa zea</i> | Узбекистан* | KJ004000 | 32226 | 32614 | 98.97 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa armigera</i> | Индия | KM357512 | 1895 | 2283 | 99.23 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> SNPV | <i>Helicoverpa armigera</i> | Австралия | KJ922128 | 32207 | 32595 | 98.97 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa armigera</i> | Южная Африка | AY118080 | 460 | 848 | 98.97 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Heliothis peltigera</i> | Турция | MK507817 | 32100 | 32488 | 98.46 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa armigera</i> | Китай | MT810812 | 32536 | 32924 | 98.46 |
| <i>Helicoverpa assulta</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Helicoverpa assulta</i> | Китай | MG569706 | 32470 | 32858 | 98.20 |
| <i>Hyblaea puera</i> nucleopolyhedrovirus | <i>Hyblaea puera</i> | Индия | MH254887 | 29 | 341 | 98.72 |

* Согласно Колосову А.В., личное сообщение.

under the number ON099402, showed similarity with homologous *N. bombycis* sequences at the level of 96–99%, while similarity to other closely related species was 93% for *N. dissitriae* (# HQ457438), 92% for *N. fumiferanae* (# HQ457435) and 91% for *N. pyrausta* (# MG182018). Spores

isolated from the infected cotton bollworm larva measured 3.2–4.5(mean 3.9) × 2.0–2.7(mean 2.4) μm (n=12) and *N. bombycis* spores from silkworm – 3.8–4.4(mean 4.0) × 2.2–2.8(mean 2.4) μm (n=11).

Discussion

Baculoviruses and microsporidia are widely distributed in nature, and their detection in populations of the cotton bollworm is quite expected. In addition, since bacteria of the genus of *Wolbachia* are also widespread among Lepidoptera, it was expected to detect their presence in the studied samples of *H. armigera*. Yet, no *Wolbachia* was found. This can be due to the low frequency of this endosymbiont, as well as due to its uneven spatial and temporal distribution in local populations of the pest. In particular, though no published data in scientific literature were found concerning *Wolbachia* in the cotton bollworm, presence of respective GenBank entries indirectly indicate occasional detection of this endosymbiont in this host in India (# KY781914) and China (## EU399644 and EU753172).

Since the species diversity of baculoviruses in cotton bollworms over the vast territory of Russia had been practically unexplored at the beginning of the work, diagnostics was

aimed at detecting baculovirus infections using degenerate primers, because of high evolutionary lability of viral genomes (Herniou et al., 2004). The virus isolates were found in only one geographic location, and the sequences of all of them were identical to each other and showed the maximum similarity to the HearNPV and HzNPV entries available in GenBank, with only minor genetic differences. Unfortunately, sequencing of the *lef8* locus had insufficient resolution to differentiate these species and, accordingly, to accurately diagnose the new isolates. This goal should therefore recruit analysis of other, more polymorphic loci (protein kinase, DNA polymerase, DNA helicase, chitinase, zinc finger protein, etc.) or whole genome sequencing. In addition, it is possible that the two indicated above species of the virus should rather be considered as intraspecific isolates, since they cross-infect American cotton bollworms and the cotton bollworms, the closely related insect species. In addition, levels of genetic

Table 5. Results of BLAST analysis of the complete genome of the HS-18 strain against the *Helicoverpa zea* nucleopolyhedrovirus (gray background) and *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus sequences.**Таблица 5.** Результаты BLAST-анализа полного генома штамма ХС-18 относительно сиквенсов *Helicoverpa zea* nucleopolyhedrovirus (серый фон) и *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus.

| Species, strain Вид, изолят | GenBank Accession # Номер доступа в GenBank | Identity level, % Уровень сходства, % |
|---|--|--|
| <i>Helicoverpa zea</i> single nucleopolyhedrovirus | KJ004000 | 100.00 |
| <i>Helicoverpa zea</i> single nucleopolyhedrovirus | AF334030 | 99.97 |
| <i>Helicoverpa</i> SNPV AC53 | KM596835 | 99.96 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> SNPV | KJ909666 | 99.55 |
| <i>Helicoverpa</i> SNPV AC53 | KJ922128 | 99.54 |
| <i>Helicoverpa</i> SNPV AC53 | KU738896 | 99.23 |
| <i>Helicoverpa</i> SNPV AC53 | KU738904 | 99.20 |
| <i>Helicoverpa</i> SNPV AC53 | KU738901 | 99.20 |
| <i>Helicoverpa</i> SNPV AC53 | KU738899 | 99.20 |
| <i>Helicoverpa</i> SNPV AC53 | KU738902 | 99.20 |
| <i>Helicoverpa</i> SNPV AC53 | KU738900 | 99.20 |
| <i>Helicoverpa</i> SNPV AC53 | KU738897 | 99.20 |
| <i>Helicoverpa</i> SNPV AC53 | KU738898 | 99.19 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> NPV NNg1 | KU738903 | 99.13 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | AP010907 | 99.00 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | KJ701029 | 98.84 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | KJ701033 | 99.20 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | KJ701032 | 99.11 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | KJ701030 | 99.01 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> NPV strain Australia | KJ701031 | 99.00 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus G4 | JN584482 | 98.90 |
| <i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus | AF271059 | 98.78 |
| <i>Helicoverpa zea</i> single nucleopolyhedrovirus | AF303045 | 98.44 |

Table 6. GenBank entries of microsporidia isolates showing 100% identity of small subunit ribosomal RNA sequence to the microsporidium from *Helicoverpa armigera* identified in the present study**Таблица 6.** Записи в GenBank для изолятов микроспоридий, демонстрирующие 100% идентичность последовательности малой субъединицы рибосомной РНК с микроспоридией из *Helicoverpa armigera*, выявленной в настоящем исследовании

| Species, isolate Вид, изолят | Host species Вид хозяина | Country Страна | GenBank Accession # Номер доступа в GenBank |
|--|---------------------------------|-------------------|--|
| <i>Nosema bombycis</i> | <i>Bombyx mori</i> | Japan | AB125665 |
| <i>Nosema bombycis</i> | <i>Antheraea mylitta</i> | India | AB036052 |
| <i>Nosema bombycis</i> | <i>Bombyx mori</i> | Japan | AY259631 |
| <i>Nosema bombycis</i> | <i>Bombyx mori</i> | No data | EU864525 |
| <i>Nosema bombycis</i> (<i>Nosema heliothidis</i>) | <i>Helicoverpa armigera</i> | China | FJ772435 |
| <i>Nosema bombycis</i> (<i>Nosema spodopterae</i>) | <i>Spodoptera litura</i> | Taiwan | AY747307 |
| <i>Nosema bombycis</i> GD 1 | <i>Bombyx mori</i> | China | JF443582 |
| <i>Nosema bombycis</i> GNB3 | <i>Bombyx mori</i> | China | MT510128 |
| <i>Nosema bombycis</i> GX 1 | <i>Bombyx mori</i> | China | JF443577 |
| <i>Nosema bombycis</i> Sd-NU-IW8401 | <i>Spodoptera depravata</i> | Japan | D85504 |
| <i>Nosema bombycis</i> SES-NU | <i>Bombyx mori</i> | Japan | D85503 |
| <i>Nosema</i> sp. C01 | <i>Pieris rapae</i> | South Korea | AY383655 |
| <i>Nosema</i> sp. CmM1 | <i>Cnaphalocrocis medinalis</i> | China | KC836091 |
| <i>Nosema</i> sp. CP JX-2014 | <i>Catopsilia pyranthe</i> | China | KM001609 |
| <i>Nosema</i> sp. <i>Hyblaea puera</i> 1 | <i>Hyblaea puera</i> | India | GQ244502 |
| <i>Nosema</i> sp. AA1 | <i>Antheraea assamensis</i> | India | MG584870 |
| <i>Nosema</i> sp. OSL-2014-3 | <i>Spodoptera litura</i> | Japan | LC422302 |
| <i>Nosema</i> sp. PM-1 | <i>Papilio machaon</i> Linnaeus | China | KM190863 |
| <i>Nosema</i> sp. PX1 | <i>Plutella xylostellae</i> | Taiwan | AY960986 |
| <i>Nosema</i> sp. 'S. litura' | <i>Spodoptera litura</i> | Taiwan | AF238239 |
| <i>Nosema</i> sp. TWSL-2014-1 | <i>Spodoptera litura</i> | Taiwan | LC422303 |
| <i>Nosema</i> sp. VSI-2007-13 | <i>Spodoptera litura</i> | Viet Nam | AB569602 |
| <i>Nosema</i> sp. YGSL-2015-2 | <i>Spodoptera litura</i> | Japan | LC422315 |
| <i>Nosema</i> sp. YY-2018a | <i>Athetis lepigone</i> | China | MF150255 |

divergence between viral isolates are extremely low, even when comparing among genome-wide sequences, (Kolosov et al., 2017). Detection of viruses with the same *lef8* haplotype in the phylogenetically distant species of *H. puera*, registered in GenBank, is interesting. However, the host identification requires additional verification, since infection of distantly related host species does not correspond to modern ideas about the species specificity of baculoviruses (Thiem, 1997; Song et al., 2016).

As for microsporidia, the range of their potential hosts is much wider. In particular, *N. bombycis* was isolated from various Lepidoptera, including representatives of the Noctuidae family (Iwano and Ishihara, 1991; Tokarev et al., 2020). The *rpb1* sequence of the new isolate was identical to the GenBank entry for *N. bombycis*, and its morphometric characteristics coincided with those of *N. bombycis*, which allows us to consider the microsporidia from the cotton bollworm as an isolate of this species. This corresponds to the wide range of hosts of this microsporidium confirmed by molecular genetic analysis of the natural *N. bombycis* infections in different species of Lepidoptera (Tokarev et al., 2020).

Interpreting low levels of occurrence of microsporidia and baculoviruses in local populations of the cotton bollworm, one should take into account the fact that the analyzed samples were collected over a limited period of time, during the pest outbreak in 2018–2020. An increase in prevalence of microsporidia and viruses corresponding to the growth of population density beneficial to horizontal transmission, has been recorded for various Lepidoptera species including *L. dispar* (Solter et al., 2010), *Choristoneura pinus* (van Frankenhuyzen et al., 2011), *Tortrix viridana* (Lipa, Madziara-Borusiewicz, 1976), *Taragama siva* (Ahmed, Kumar, 1998), *S. exempta* (Odindo, 1983). It could be presumed that in the case of the cotton bollworm, pathogens' prevalence levels do not increase during the outbreaks. This can be explained by high motility of larvae that helps to avoid overcrowding and cannibalism. Interestingly, cannibalism was repeatedly reported under laboratory conditions but never observed in the field (Dhandapani et al., 1993; Kakimoto et al., 2003; Zalucki et al., 2021). We hope that further studies will clarify the interactions between the prevalence of infections with endosymbionts and dynamics of *Helicoverpa armigera* population density.

Acknowledgments

Authors are thankful to Aleksey V. Kolosov

(State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Novosibirsk Region, Russia) for HS-18 strain sample, Inna V. Grushevaya (All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia) for *Wolbachia* and *Nosema* DNA samples, and Igor V. Senderskiy (All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia) for *N. bombycis* spores, as well as to Yuliya S. Sokolova (George Washington University, Washington, US) for English correction of the manuscript.

The research was supported by Russian Science Foundation, project # 20-66-46009.

The research was performed using the equipment of the Core Centrum “Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology” at the All-Russian Institute of Agricultural Microbiology and the Core Centrum “Innovative plant protection technologies” at the All-Russian Institute of Plant Protection (St. Petersburg, Russia).

References

- Agasieva IS, Nefedova MV, Fedorenko EV, Mkrtychyan AO (2019) Compatibility of entomophages with biological and biorational plant protection products. *Agricultural Biology* 54(1):101–109. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.1.101rus> (In Russian)
- Ahmed SI, Kumar S (1998) Role of natural epizootics of a NPV disease in controlling *Prosopis juliflora* defoliator *Taragama siva* outbreak in North-West Rajasthan. *Indian forester* 124(11):952–958
- Ahmed MZ, Araujo-Jnr EV, Welch JJ, Kawahara AY (2015) *Wolbachia* in butterflies and moths: geographic structure in infection frequency. *Front Zool* 12 (1):1–16. <https://doi.org/10.1186/s12983-015-0107-z>
- Ahmed S, Zia K, Shah NR (2004) Validation of chemical control of gram pod borer, *Helicoverpa armigera* (Hub.) with new insecticides. *Int J Agric Biol* 6(6):978–980
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) «Basic local alignment search tool.» *J Mol Biol* 215:403–410
- Arai H, Hirano T, Akizuki N, Abe A et al (2019) Multiple infection and reproductive manipulations of *Wolbachia* in *Homona magnanima* (Lepidoptera: Tortricidae). *Microbial Ecol* 77(1):257–266. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1210-4>
- Ardisson-Araújo DM, Sosa-Gómez DR, Melo FL, Bão SN, Ribeiro BM (2015) Characterization of *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus isolated in Brazil during the first old world bollworm (Noctuidae: *Helicoverpa armigera*) nationwide outbreak. *Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE)*. <https://doi.org/10.17525/vrrjournal.v20i1.254>
- Armes NJ, Jadhav DR, De Souza KR (1996) A survey of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* in the Indian sub-continent. *Bull Entomol Res* 86:499–514
- Arnemann JA, James WJ, Walsh TK, Guedes JVC, Smagghe G, Castiglioni E, Tay WT (2016) Mitochondrial DNA COI characterization of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Paraguay and Uruguay. *Genet Mol Res* 15(2):15028292. <https://doi.org/10.4238/gmr.15028292>
- Arrizubieta M, Williams T, Caballero P, Simón O (2014) Selection of a nucleopolyhedrovirus isolate from *Helicoverpa armigera* as the basis for a biological insecticide. *Pest Manag Sci* 70(6):967–976
- Baillie VL, Bouwer G (2012) High levels of genetic variation within *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus populations in individual host insects. *Arch Virol* 157(12):2281–2289
- Becnel JJ, Andreadis TG (2014) Microsporidia in Insects. In: Weiss LM, Becnel JJ (eds) *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*, First Edition. Wiley: New York. 521–570. <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch21>
- Bhat SA, Bashir I, Kamili AS (2009) Microsporidiosis of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera – Bombycidae): A review. *Afr J Agric Res* 4(13):1519–1523. <https://doi.org/10.5897/AJAR.9000490>

- Binod P, Sukumaran RK, Shirke SV, Rajput JC, Pandey A (2007) Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. *J Appl Microbiol* 103(5):1845–1852. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03428.x>
- Bouchon D, Rigaud T, Juchault P (1998) Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc R Soc Lond B* 265(1401):1081–1090. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0402>
- Bykov RA, Yurlova GV, Demenkova MA, Dubatolov VV et al (2020) High *Wolbachia* prevalence in populations of Siberian silk moth *Dendrolimus superans sibiricus* Tschetverikov, 1908 (Lepidoptera: Lasiocampidae) in the territory of Russia. *Zhurnal obshchey biologii* 81(5):387–393. (In Russian). <https://doi.org/10.31857/S0044459620050036>
- Bykov R, Yurlova G, Demenkova M, Ilinsky Y (2021) Is *Aporia crataegi* unsuitable host of *Wolbachia* symbionts? *Plant Protection News* 104(1):53–60. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2021-104-1-14945>
- Charlat S, Engelstädter J, Dyson EA, Hornett EA et al (2006) Competing selfish genetic elements in the butterfly *Hypolimnas bolina*. *Current Biology* 16(24):2453–2458. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.062>
- Charlat S, Hornett EA, Fullard JH, Davies NR et al (2007) Extraordinary flux in sex ratio. *Science* 317(5835):214–214. <https://doi.org/10.1126/science.1143369>
- Chen X, Sun X, Hu Z, Li M, O'Reilly DR, Zuidema D, Vlak JM (2000) Genetic engineering of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus as an improved pesticide. *J Invertebr Pathol* 76(2):140–146. <https://doi.org/10.1006/jjpa.2000.4963>
- Cherry AJ, Rabindra RJ, Parnell MA, Geetha N, Kennedy JS, Grzywacz D (2000) Field evaluation of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus formulations for control of the chickpea pod-borer, *H. armigera* (Hubn.), on chickpea (*Cicer arietinum* var. Shoba) in southern India. *Crop Protection* 19(1):51–60. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(99\)00089-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(99)00089-7)
- Chenkin AF, Cherkasova VA, Zakharenko VA, Goncharov NR (1990) Handbook of an agronomist on plant protection. Moscow: Agropromizdat 367p. (In Russian)
- Cunningham JP, Zalucki MP (2014) Understanding Heliothine (Lepidoptera: Heliothinae) pests: what is a host plant? *J Econ Entomol* 107:881–896. <https://dx.doi.org/10.1603/EC14036>
- Czepak C, Albernaz C, Vivan LM, Guimarães HO, Carvalhais T (2013) First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pesq Agropec Trop* 43:110–113
- Dhandapani N, Jayaraj S, Rabindra RJ (1993) Cannibalism on nuclear polyhedrosis virus infected larvae by *Heliothis armigera* (Hubn.) and its effect on viral infection. *Insect Sci Appl* 14:427–430
- Dyson EA, Hurst GDD (2004) Persistence of an extreme sex-ratio bias in a natural population. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(17):6520–6523. <https://doi.org/10.1073/pnas.0304068101>
- Erlanson MA (2009) Genetic variation in field populations of baculoviruses: Mechanisms for generating variation and its potential role in baculovirus epizootiology. *Virol Sin* 24:458. <https://doi.org/10.1007/s12250-009-3052-1>
- Eroglu GB, Demir I, Demirbag Z (2018) A novel alphabaculovirus isolated from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae): characterization and pathogenicity. *Biologia* 73:545–551. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0053-2>
- Eroglu GB, Nalçacıoğlu R, Demirbağ Z (2019) A new *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus isolate from *Heliothis peltigera* (Denis & Schiffermuller) (Lepidoptera: Noctuidae) in Turkey. *Turk J Biol* 43(5):340–348. <https://doi.org/10.3906/biy-1902-64>
- Farrow RA, Daly JC (1987) Long-range movements as an adaptive strategy in the genus *Heliothis* (Lepidoptera, Noctuidae): a review of its occurrence and detection in four pest species. *Aust J Zool* 35:1–24
- Fitt GP (1989) The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Annu Rev Entomol* 34:17–52
- Frolov AN, Malysh YM, Tokarev YS (2008) Biological features and population density forecasts of the beet webworm *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera, Pyraustidae) in the period of low population density of the pest in Krasnodar Territory. *Entomol Rev* 88:666–675 (in Russian)
- Fuxa JR (1982) Prevalence of viral infections in populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in Southeastern Louisiana. *Environ Entomol* 11(1):239–242. <https://doi.org/10.1093/ee/11.1.239>
- Fuxa JR, Richter AR (1999) Classical biological control in an ephemeral crop habitat with *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *BioControl* 44:405–421. <https://doi.org/10.1023/A:1009990709230>
- Gaugler RR, Brooks WM (1975) Sublethal effects of infection by *Nosema heliothidis* in the corn earworm, *Heliothis zea*. *J Invertebr Pathol* 26(1):57–63
- Gomes ES, Santos V, Ávila CJ (2017) Biology and fertility life table of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in different hosts. *Entomol Sci* 20(1):419–426. <https://doi.org/10.1111/ens.12267>
- Graham RI, Wilson K (2012) Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial selective sweep in a migratory African insect. *BMC Evol Biol* 12(1):204. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-204>
- Grushevaya IV, Ignatieva AN, Malysh SM, Senderskiy IV, Zubarev IV, Kononchuk AG (2018) Spore dimorphism in *Nosema pyrausta* (Microsporidia, Nosematidae): from morphological evidence to molecular genetic verification. *Acta Protozool* 57:49–52. <https://doi.org/10.4467/16890027AP.18.004.8398>
- Haile F, Nowatzki T, Storer N (2021) Overview of pest status, potential risk, and management considerations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) for U.S. Soybean Production. *J Integr Pest Manag* 12(1):1–10. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmaa030>
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp* 41:95–98
- Harper JD (1987) Applied epizootiology: Microbial control of insects. In: Fuxa JR, Tanada Y (eds) Epizootiology of Insect Diseases. Wiley, Sons: New York. 473–496
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14812–14817. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>

- Herniou EA, Olszewski JA, O'Reilly DR, Cory JS (2004) Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *J Virol* 78(7):3244–3251. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.7.3244-3251.2004>
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A et al (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* 281(2):215–220. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x>
- Hiroki M, Tagami Y, Miura K, Kato Y (2004) Multiple infection with *Wolbachia* inducing different reproductive manipulations in the butterfly *Eurema hecabe*. *Proc Roy Soc B: Biol Sci* 271(1549):1751–1755. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2769>
- Hopper JV, Huang WF, Solter LF, Mills NJ (2016) Pathogenicity, morphology, and characterization of a *Nosema fumiferanae* isolate (Microsporidia: Nosematidae) from the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae) in California. *J Invertebr Pathol* 134:38–47. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.01.001>
- Ilinsky Y, Kosterin OE (2017) Molecular diversity of *Wolbachia* in Lepidoptera: prevalent allelic content and high recombination of MLST genes. *Mol Phylogen Evol* 109:164–179. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.12.034>
- Ilinsky YY, Tokarev YS, Bykov RA, Yudina MA, Pavlushin SV, Inoue MN, Martemyanov VV (2017) Detection of bacterial symbionts (*Wolbachia*, *Spiroplasma*) and eukaryotic pathogen (Microsporidia) in Japanese populations of gypsy moth species (*Lymantria* spp.). *Euroasian Entomol J* 16(1):1–5
- Issi IV (1986) Microsporidia as a phylum of parasitic protozoa. In: Microsporidia. Ser. Protozoologiya. Leningrad: Nauka 10:6–135. (In Russian)
- Issi IV (2020) Development of Microsporidiology in Russia. *Plant Protection News* 103:161–176 (In Russian). <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-3-4972>
- Issi IV, Nilova GN (1967) Microsporidia parasitizing the turnip moth and the cotton bollworm under conditions of Tadzhikistan. *Izvestia Akademii Nauk Tadzhikskoy SSR* 26:65–70
- Iwano H, Ishihara R (1991) Isolation of *Nosema bombycis* from moths of the lawn grass cutworm, *Spodoptera depravata* Butler. *J Seric Sci Jpn* 60:279–287
- Jones CM, Parry H, Tay WT, Reynolds DR, Chapman JW (2018) Movement ecology of pest *Helicoverpa*: Implications for ongoing spread. *Ann Rev Entomol* 64(1):277–295. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-111959>
- Kakimoto K, Hinomoto N, Noda T (2003) Responses of three Orius species collected in Kagoshima to different rearing temperatures and photoperiods. *Jpn J App. Entomol Zool* 47:19–28. <https://doi.org/10.1303/JJAEZ.2003.19>
- Kermani N, Abu-Hassan Zainal-Abidin, Dieng H, Ismail NF, Attia M, Abd Ghani I (2013) Pathogenicity of *Nosema* sp. (Microsporidia) in the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *PLoS One* 8:e62884. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062884>
- Kolosov AV, Ternovoy VA, Shvalov AN, Moiseeva AA, Safatov AS, Mikheev VN (2017) Adaptation of the single-capsid nuclear polyhedrosis virus of the American cotton scoop (*Helicoverpa zea* SNPV) to control the population of the cotton scoop (*Helicoverpa armigera*). *Voprosy virusologii* 62(3):134–137. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-134-137> (In Russian)
- Knox OGG, Anderson CMT, Ross JL, Tann CCR, Gupta VVSR (2016). Organisms with potential to assist in the control of *Helicoverpa armigera* in Australian cotton production systems. *Crop Pasture Sci* 67(12):1288. <https://doi.org/10.1071/cp16270>
- Lee MJ, Anstee JH (1992) An ultrastructural study on stages in the life cycle of a microsporidian parasite (Microspora: Nosematidae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Invertebr Pathol* 59(3):271–279
- Leslie Hayes J, Bell M (1994) Evaluation of early-season baculovirus treatment for suppression of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) over a wide area. *J Econ Entomol* 87(1):58–66
- Lipa J, Madziara-Borusiewicz K (1976) Microsporidians parasitizing the green tortrix (*Tortrix viridana* L.) in Poland and their role in the collapse of the tortrix outbreak in Puszcza Niepolomicka during 1970–1974. *Acta Protozool* 15:529–536
- Malysh JM, Chertkova EA, Tokarev YS (2021) The microsporidium *Nosema pyrausta* as a potent microbial control agent of the beet webworm *Loxostege sticticalis*. *J Invertebr Pathol* 186:107675
- Malysh JM, Kononchuk AG, Frolov AN (2019) Detection of microsporidia infecting beet webworm *Loxostege sticticalis* (Pyraloidea: Crambidae) in European part of Russia in 2006–2008. *Plant Protection News* 2:45–51. [https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-2\(100\)-45-51](https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-2(100)-45-51)
- Malysh J, Malysh S, Kireeva D, Kononchuk A, Demenkova M (2020) Detection of *Wolbachia* in larvae of *Loxostege sticticalis* (Pyraloidea: Crambidae) in European and Asian parts of Russia. *Plant Protection News* 103(1):49–52. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-1-49-52>
- Malysh YuM, Tokarev YuS, Sitnikova NV, Kononchuk AG, Grushetskaya TA, Frolov AN (2011) Incidence of microsporidian infection of stem borers of the genus *Ostrinia* (Lepidoptera: Crambidae) in Krasnodar territory. *Parazitologiya* 45(3):234–244 (In Russian)
- McManus ML, Solter F (2003) Microsporidian Pathogens in European gypsy moth populations. In: McManus ML, Liebhold AM (eds) Proceedings: ecology, survey and management of forest insects. Newtown Square: USDA. pp. 44–51
- Mitchell MJ, Cali A (1994) *Vairimorpha necatrix* (Microsporida: Burenellidae) affects growth and development of *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) raised at various temperatures. *J Econ Entomol* 87(4):933–940
- Mohan M, Sushil SN, Bhatt JC, Gujar GT, Gupta HS (2008) Synergistic interaction between sublethal doses of *Bacillus thuringiensis* and *Campoletis chlorideae* in managing *Helicoverpa armigera*. *BioControl* 53:375–386. <https://doi.org/10.1007/s10526-007-9079-z>
- Moscardi F (1999) Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Ann Rev Entomol* 44(1):257–289
- Murúa MG, Scalora FS, Navarro FR, Cazado LE, Casmuz A et al (2014) First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. *The Florida Entomologist* 97(2):854–856. <https://doi.org/10.1653/024.097.0279>
- Narita S, Kageyama D, Nomura M, Fukatsu T (2007) Unexpected mechanism of symbiont-induced reversal of insect sex: feminizing *Wolbachia* continuously acts on the butterfly *Eurema hecabe* during larval development.

- Appl Environ Microbiol* 73(13):4332–4341. <https://doi.org/10.1128/AEM.00145-07>
- Odindo MO (1983) Epizootiological observations on a nuclear polyhedrosis of the African armyworm *Spodoptera exempta* (Walk.). *Internat J Trop Insect Sci* 4(3):291–298
- Patil NS, Jadhav JP (2015) Significance of *Penicillium ochrochloron* chitinase as a biocontrol agent against pest *Helicoverpa armigera*. *Chemosphere* 128:231–235. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.038>
- Pei B, Wang C, Yu B, Xia D, Li T, Zhou Z (2021) The first report on the transovarial transmission of microsporidian *Nosema bombycis* in lepidopteran crop pests *Spodoptera litura* and *Helicoverpa armigera*. *Microorganisms* 9(7):1442
- Pilarska D, Takov D, Hylíš M, Radek R, Fiala I, Solter L, Linde (2017) Natural occurrence of microsporidia infecting Lepidoptera in Bulgaria. *Acta Parasitol* 62(4):858–869. <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0104>
- Rabindra RJ, Jayaraj S (1994) Effect of certain botanicals on the incidence of *Vairimorpha* sp. in *Helicoverpa armigera* larvae. *J Biol Control* 8(1):61–63
- Riaz S, Johnson JB, Ahmad M, Fitt GP, Naiker M. (2021) A review on biological interactions and management of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Appl Entomol* 145(6):467–498. <https://doi.org/10.1111/jen.12880>
- Salunke BK, Salunkhe RC, Dhotre DP, Walujkar SA et al (2012) Determination of *Wolbachia* diversity in butterflies from Western Ghats, India, by a multigene approach. *Appl Environ Microbiol* 78(12):4458–4467. <https://doi.org/10.1128/AEM.07298-11>
- Salunkhe RC, Narkhede KP, Shouche YS (2014) Distribution and evolutionary impact of *Wolbachia* on butterfly hosts. *Indian J Microbiol* 54(3):249–254. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0448-x>
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor laboratory.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74(12):5463–5467
- Shapiro M, Farrar RRJr, Domek J, Javaid I (2002) Effects of virus concentration and ultraviolet irradiation on the activity of corn earworm and beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedroviruses. *J Econ Entomol* 95(2):243–249. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.2.243>
- Simoës RA, Feliciano JR, Solter LF, Delalibera IJr (2015) Impacts of *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae) on the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J Invertebr Pathol* 129:7–12. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.006>
- Singh SP, Ballal CR, Poorani J (2002) Old world bollworm *Helicoverpa armigera*, associated Heliethinae and their natural enemies. *Project Directorate Biol Control Tech Bull* 31:135
- Song J, Wang X, Hou D, Huang H, Liu X, Deng F et al (2016) The host specificities of baculovirus *per os* infectivity factors. *PLoS One* 11(7):e0159862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159862>
- Solovyev VI, Ilinsky Y, Kosterin OE (2015) Genetic integrity of four species of *Leptidea* (Pieridae, Lepidoptera) as sampled in sympatry in West Siberia. *Comparative cytogenetics* 9(3):299. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v9i3.4636>
- Solter LF, Maddox JV, McManus ML (1997) Host specificity of microsporidia (Protista: Microspora) from European populations of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) to indigenous North American Lepidoptera. *J Invertebr Pathol* 69:135–150
- Solter LF, Pilarska D K, McManus ML, Zúbrik M, Patočka J, Huang WF, Novotný J (2010) Host specificity of microsporidia pathogenic to the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.): Field studies in Slovakia. *J Invertebr Pathol* 105(1):1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.04.009>
- Suryanarayanan TS, Govinda Rajulu MB, Vidal S (2016) Biological control through fungal endophytes: Gaps in knowledge hindering success. *Curr Biotechnol* 5(3):185–198 <https://doi.org/10.2174/2211550105666160504130322>
- Tagami Y, Miura K (2004) Distribution and prevalence of *Wolbachia* in Japanese populations of Lepidoptera. *Insect Mol Biol* 13(4):359–364. <https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00492.x>
- Tay WT, Soria MF, Walsh T, Thomazoni D, Silvie P, Behere GT, Anderson C, Downes S (2013) A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *PLoS One* 8(11):e80134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080134>
- Thiem SM (1997) Prospects for altering host range for baculovirus bioinsecticides. *Curr Opin Biotechnol* 8(3):317–322
- Tokarev YS, Huang WF, Solter LF, Malysh JM, Becnel JJ, Vossbrinck CR (2020) A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *J Invertebr Pathol* 169:107279. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107279>
- Tokarev YS, Timofeev SA, Malysh JM, Tsarev AA, Ignatieva AN, Tomilova OG, Dolgikh VV (2019) Hexokinase as a versatile molecular genetic marker for Microsporidia. *Parasitology* 146:472–478. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001737>
- Tokarev YS, Yudina MA, Malysh JM, Bykov RA et al (2017) Prevalence rates of *Wolbachia* endosymbiotic bacterium in natural populations of *Ostrinia nubilalis* and *Ostrinia scapularis* (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae) in South-Western Russia. *Ecological genetics* 15(1):44–49. <https://doi.org/10.17816/ecogen15144-49>
- Tagami Y, Miura K (2004) Distribution and prevalence of *Wolbachia* in Japanese populations of Lepidoptera. *Insect Mol Biol* 13:359–364. <https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00492.x>
- Van Frankenhuyzen K, Ryall K, Liu Y, Meating J, Bolan P, Scarr T (2011) Prevalence of *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae) during an outbreak of the jack pine budworm in Ontario. *J Invertebr Pathol* 108(3):201–208
- Van Frankenhuyzen K, Nystrom C, Liu Y (2007) Vertical transmission of *Nosema fumiferanae* (Microsporidia: Nosematidae) and consequences for distribution, post-diapause emergence and dispersal of second-instar larvae of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). *J Invertebr Pathol* 96(2):173–182. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.03.017>
- Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, et al. (2000) Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses Seventh Report

- of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Oxford: Academic Press
- Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci* 76:615–619
- Weiss LM, Vossbrinck CR (1999) Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the Microsporidia. The microsporidia and microsporidiosis. Washington: ASM Press. pp. 129–171
- Werren JH, Baldo L, Clark ME (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Rev Microbiol* 6(10):741–751. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>
- Williams T, López-Ferber M, Caballero P (2022) Nucleopolyhedrovirus coocclusion technology: a new concept in the development of biological insecticides. *Front Microbiol* 25(12):810026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.810026>
- Wittner M (1999) Historic perspective on the microsporidia: expanding horizons. In: Wittner M, Weiss LM (eds) The microsporidia and microsporidiosis. Washington: ASM Press. pp. 1–6
- Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ (2008) Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science* 321: 1676–1678
- Yang Y, Li Y, Wu Y (2013) Current status of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* after 15 years of Bt cotton planting in China. *J Econ Entomol* 106(1):375–381, <https://doi.org/10.1603/EC12286>
- Yu H, Meng J, Xu J, Liu TX, Wang D (2015) A novel neurotoxin gene ar1b recombination enhances the efficiency of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus as a pesticide by inhibiting the host larvae ability to feed and grow. *PLoS One* 10(8):e0135279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135279>
- Yu FL, Wu G, Liu TJ, Zhai BP, Chen FJ (2008) Effects of irrigation on the performance of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) during different pupal stages. *Internat J Pest Management* 54:137–142
- Zalucki JM, Heckel DG, Wang P, Kuwar S et al (2021) A generalist feeding on Brassicaceae: It does not get any better with selection. *Plants* 10(5):954. <https://doi.org/10.3390/plants10050954>
- Zelinskaya LM (1980) Role of microsporidia in the abundance dynamics of the gypsy moth, *Porthetria dispar*, in forest plantings along the lower Dnieper river (Ukrainian Republic, USSR). *Vestn Zool* 1:57–62
- Zhou W, Rousset F, O'Neil S (1998) Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc Biol Sci* 265(1395):509–515
- Zug R, Hammerstein P (2012) Still a Host of Hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PLoS One* 7(6):e38544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038544>

Вестник защиты растений, 2022, 105(1), с. 50–61

OECD+WoS: 1.06+IY (Entomology)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-1-15260>

Полнотекстовая статья

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЭНДОСИМБИОНТОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ ХЛОПКОВОЙ СОВКИ *HELICOVERPA ARMIGERA* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) В ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

А.Г. Конончук*, С.М. Малыш, А.С. Румянцева, Д.С. Киреева, А.В. Герус, В.С. Журавлёв

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

* ответственный за переписку, e-mail: akononchuk@vizr.spb.ru

Хлопковая совка *Helicoverpa armigera* – один из самых многоядных и космополитичных видов фитофагов. Внутриклеточные эндосимбионты широко распространены в популяциях чешуекрылых насекомых и часто имеют важное значение в их динамике численности. Данные о распространении энтомопатогенов у хлопковой совки на территории России в современных условиях практически отсутствуют. Гусеницы и имаго хлопковой совки были собраны в 2018–2020 гг. в Краснодарском крае, Воронежской и Саратовской областях и проанализированы методом ПЦР с использованием наборов группо-специфичных праймеров на бакуловирусы (локус *lef8*), бактерий рода *Wolbachia* (локус *wsp*) и микроспоридий (локус SSU rRNA) в количестве от 131 до 170 особей для разных групп патогенов. Положительная реакция на бакуловирусы отмечалась на уровне 16% для выборки из 32 особей Темрюкского района Краснодарского края 2018 г. Общая зараженность для всей выборки из 170 особей составила 2.9%. Обнаружено сходство нуклеотидной последовательности *lef8* на уровне 98.7–99.6% с изолятами вирусов ядерного полиэдроза хлопковой совки и американской хлопковой совки. Результаты тестирования выборки из 131 особей на присутствие бактерий рода *Wolbachia* были отрицательными. При ПЦР-скрининге на микроспоридий получен один положительный сигнал для выборки из 19 особей Красноармейского района Краснодарского края 2019 г., что соответствует 5%. Для всей выборки из 168 проанализированных особей зараженность составила 0.6%. Нуклеотидные последовательности фрагментов генов, кодирующих SSU рРНК и большую субъединицу РНК-полимеразы II, позволило идентифицировать новый изолят как *N. bombycis*.

*ответственный за переписку, e-mail: akononchuk@vizr.spb.ru

Ключевые слова: облигатные внутриклеточные паразиты, энтомопатогенные микроорганизмы, вредные чешуекрылые, естественная зараженность, вирус ядерного полиэдроза, Microsporidia, *Wolbachia*, *Nosema bombycis*

Поступила в редакцию: 10.02.2022

Принята к печати: 07.04.2022

ПЕРСОНАЛЬНЫЕ ИДЕНТИФИКАТОРЫ АВТОРА НАУЧНЫХ РАБОТ PERSONAL IDENTIFIERS OF SCIENTIFIC PAPERS' AUTHORS

Для однозначной идентификации авторов научных трудов в международных библиометрических системах и за их пределами в настоящее время широко используются несколько видов персональных идентификаторов. Это позволяет легко и быстро идентифицировать профиль определенного автора – участника научной, образовательной и инновационной деятельности. Такие идентификаторы нужны, чтобы не спутать профили однофамильцев, отследить наукометрические показатели определённого автора,

связать деятельность ученого в различных системах электронного редактирования научных журналов с его профилем автора и рецензента научных статей, и т.п. Эти идентификаторы запрашиваются в различных системах регистрации пользователей при выдвижении кандидатов на присвоение учёного звания, при проведении конкурсов научных проектов и наград, при оценке уровня научных достижений соискателя и т.п.

ORCID

Данный идентификатор позволяет создать персональную страницу со списком публикаций, мест работы и биографией учёного, то есть использовать как удобное, универсальное и обновляемое жизнеописание, доступное онлайн. Всё чаще можно видеть, как в рукописях статей в научных журналах при указании авторов работы приводится идентификатор ORCID.

Адрес ресурса: <https://orcid.org>

Регистрация занимает несколько минут, после чего появляется возможность заполнить профиль всей необходимой информацией. В дальнейшем созданный профиль будет пополняться автоматически сведениями о новых публикациях и рецензиях статей для научных журналов.

ScopusID

Данный идентификатор создается автоматически при наличии не менее двух публикаций, индексируемых в базе данных SCOPUS, отображает перечень публикаций и основные наукометрические показатели автора в данной системе.

Адрес ресурса: <https://scopus.com>

Для поиска персональной записи автора доступна функция «проверить бесплатный профиль автора», а

опция «связать с ORCID» позволяет настроить профиль так, чтобы все публикации автора импортировались из SCOPUS в ORCID.

Для настройки следует пройти шесть простых шагов, включающих выбор учетной записи, ревизию списка публикаций и подтверждение отправки данных.

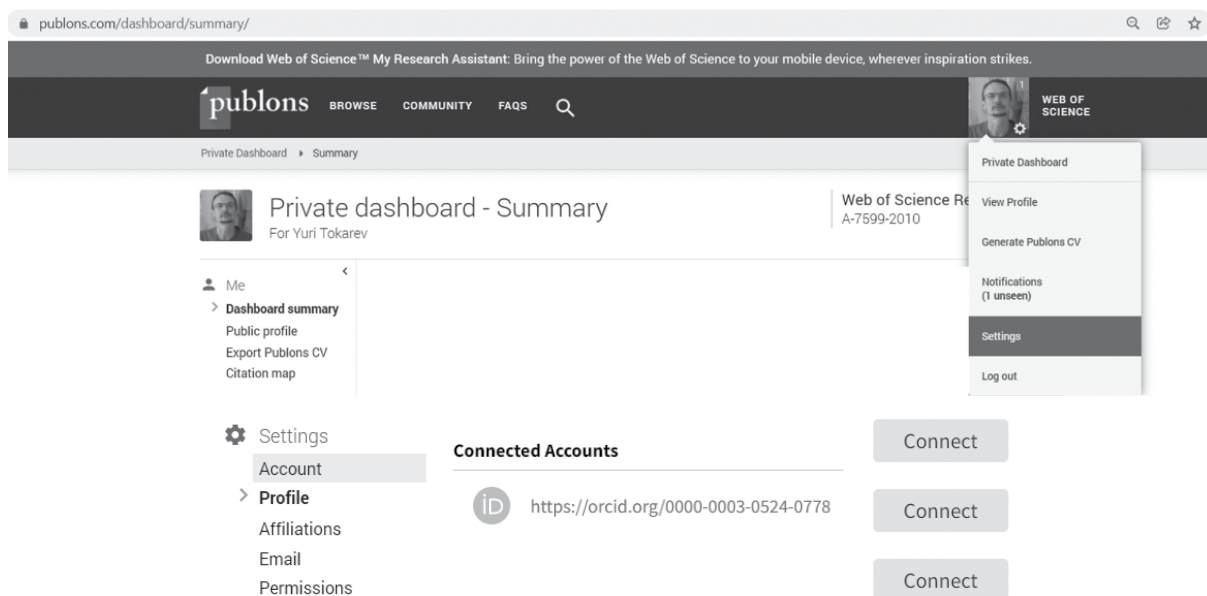
ResearcherID

Данный идентификатор создается автором вручную и служит для учета наукометрических показателей в базе данных Web of Science Core Collection. В настоящее время сервис интегрирован с порталом Publons, изначально созданным для учета деятельности ученых как авторов и рецензентов научных статей.

Адрес ресурса: <https://publons.com>

При создании учетной записи можно использовать существующую запись в других сервисах, в том числе ORCID.

Создав профиль, следует зайти в настройки («Settings»), выбрать раздел «Account», убедиться, что профиль ORCID связан с профилем Publons (или связать их с помощью опции «Connect»).



В разделе My Records>Publications можно добавлять публикации. Для этого пользователям Publons открыт комплиментарный доступ к Web of Science, где формируется список публикаций автора, требующий проверки во избежание добавления чужих и дублированных публикаций.

Помимо этого, можно добавить другие публикации с помощью опции «Import by Identifier», указав DOI или другой идентификатор опубликованной статьи. Удалить чужие публикации из уже сформированного списка (My Records>Publications) можно, дважды кликнув на иконку мусорной корзины в правой ячейке таблицы со статьями.

РИНЦ Author ID

Для учета библиографических записей и наукометрических показателей для российских авторов в Научной Электронной Библиотеке генерируется профиль Science Index с присвоением персонального идентификатора РИНЦ Author ID.

Адрес ресурса: <https://elibrary.ru>

В автоматическом режиме система формирует список публикаций из разных источников, в том числе из списков литературы опубликованных работ, в связи с чем возможна некорректная привязка чужих публикаций к персональному профилю, особенно при совпадении ФИО разных авторов. В разделе «Science Index для авторов» доступны подробные инструкции по работе в системе.

НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ БИБЛИОТЕКА eLIBRARY.RU

ЧИТАТЕЛЯМ | ОРГАНИЗАЦИЯМ | ИЗДАТЕЛЬСТВАМ | АВТОРАМ | БИБЛИОТЕКАМ

ОСНОВНЫЕ ПРОЕКТЫ НА ПЛАТФОРМЕ eLIBRARY.RU

Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU - это крупнейший российский информационно-аналитический портал в области науки, технологии, медицины и образования, содержащий рефераты и полные тексты более 38 млн научных публикаций и патентов, в том числе электронные версии более 5600 российских научно-технических журналов, из которых более 4800 журналов в открытом доступе. Подробнее...

- РОССИЙСКИЙ ИНДЕКС НАУЧНОГО ЦИТИРОВАНИЯ**
Национальная библиографическая база данных научного цитирования, аккумулирующая более 12 миллионов публикаций российских ученых, а также информацию о цитировании этих публикаций из более 6000 российских журналов
- SCIENCE INDEX ДЛЯ ОРГАНИЗАЦИЙ**
Информационно-аналитическая система Science Index для анализа публикационной активности и цитируемости научных организаций
- SCIENCE INDEX ДЛЯ АВТОРОВ**
Инструменты и сервисы, предлагаемые для зарегистрированных авторов научных публикаций

НОВОСТИ И ОБЪЯВЛЕНИЯ

- 06.04 Запущена система идентификации научных публикаций с использованием кодов eLIBRARY Document Number (EDN)
- 14.03 Интервью Геннадия Еременко «Газете.Ru» о новой системе оценки научной деятельности
- 21.02 26-29 апреля 2022 года состоится 10-я Международная научно-практическая конференция «Научное издание международного уровня – 2022: от настоящего к будущему» (НИПК «НИМУ – 2022»)
- 08.02 Компания Антиплагиат приглашает на круглый стол онлайн, который пройдет 16 февраля в 11:00 (МСК) Тема круглого стола: «Войти в одну реку дважды: дублированные публикации в российских журналах».
- 13.01 В анализе публикационной активности организации добавлена возможность выгрузки данных для формирования публикационного отчета в ЕГИСУ НИОКТР

Другие новости

ПЕРСОНАЛЬНЫЙ ПРОФИЛЬ АВТОРА

Персональный профиль автора - это раздел, где собраны инструменты и сервисы, предназначенные для Вас, как автора научных публикаций. Вы можете самостоятельно корректировать список своих публикаций и цитирований в РИНЦ, получать актуальную информацию о цитировании публикаций не только в РИНЦ, но и в Web of Science и Scopus, готовить и отправлять рукописи в научные журналы через систему "Электронная редакция" и т.д.

- ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ**
Как зарегистрироваться и работать со списком своих публикаций в РИНЦ - подробная инструкция для авторов
- ВИДЕОИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ**
Как зарегистрироваться и работать со списком своих публикаций и цитирований в РИНЦ - краткая презентация для авторов
- РЕГИСТРАЦИОННАЯ КАРТОЧКА АВТОРА**
Регистрационная анкета, которую Вы заполнили при регистрации в качестве автора в системе SCIENCE INDEX. Вы можете в любой момент скорректировать или дополнить информацию в карточке автора, например, поменять организацию при смене места работы и т.д.
- МОИ ПУБЛИКАЦИИ**
Список публикаций в РИНЦ, автором которых Вы являетесь. Вы можете корректировать этот список, например, просмотреть список непривязанных публикаций (в которых Вы не идентифицированы как автор) и включить их в свой список публикаций, или удалить из списка повашие туда ошибочно публикации, автором которых Вы на самом деле не являетесь
- МОИ ЦИТИРОВАНИЯ**

ОСНОВНЫЕ ПРОЕКТЫ

- Российский индекс научного цитирования
- Science Index для организаций
- Science Index для авторов
- Science Space для издательств
- Russian Science Citation Index
- Подписка на научные журналы
- Журналы открытого доступа
- Книжная коллекция
- Конференции и семинары
- Тренинг-центр

НОВОСТИ И ОБЪЯВЛЕНИЯ

- 06.04 Запущена система идентификации научных публикаций с использованием кодов eLIBRARY Document Number (EDN)
- 14.03 Интервью Геннадия Еременко «Газете.Ru» о новой системе оценки научной деятельности
- 21.02 26-29 апреля 2022 года состоится 10-я Международная научно-практическая конференция «Научное издание международного уровня – 2022: от настоящего к будущему» (НИПК «НИМУ – 2022»)
- 08.02 Компания Антиплагиат приглашает на круглый стол онлайн, который пройдет 16 февраля в 11:00 (МСК) Тема круглого стола: «Войти в одну реку дважды: дублированные публикации в российских журналах».

Редакция журнала "Вестник защиты растений" напоминает, что подача рукописей осуществляется через личный кабинет автора на сайте журнала по адресу
<https://plantprotect.ru>

Актуальные Правила для авторов доступны онлайн по адресу
<https://plantprotect.ru/index.php/vizr/about/submissions>

Editorial Office of the journal "Plant Protection News" reminds that manuscript submission is available at the Journal's webpage
<https://plantprotect.ru>

Guides for Authors are available at
<https://plantprotect.ru/index.php/vizr/about/submissions>

Научное издание

Индекс ПМ790

Подписано к печати 18 апреля 2022 г.

Формат 60x84/8. Объем 8 п.л. Тираж 300 экз. Заказ