

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»
Институт биохимических технологий, экологии и фармации
Кафедра общей биологии и генетики

На правах рукописи



ГАЛЬЧИНСКИЙ НИКИТА ВИТАЛЬЕВИЧ

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ
ИННОВАЦИОННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ ДЛЯ
БОРЬБЫ С НАСЕКОМЫМИ-ВРЕДИТЕЛЯМИ ИЗ ПОДОТРЯДА
ГРУДОХОБОТНЫХ (HEMIPTERA: STERNORRYNCHA)**

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

диссертация на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Оберемок Владимир Владимирович

Симферополь – 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
РАЗДЕЛ 1 ИНСЕКТИЦИДЫ НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В СЕЛЬСКОМ И ЛЕСНОМ ХОЗЯЙСТВАХ (АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	14
1.1 Современные методы борьбы с вредителями: опыт применения олигонуклеотидных инсектицидов и РНК-инсектицидов	14
1.2 Ключевые изменения в направлении контактно вводимой антисмысловой ДНК-биотехнологии (КВАДб)	18
1.2.1 Предпосылки к контактному применению олигонуклеотидных инсектицидов	21
1.2.2 Биodeградация олигонуклеотидных инсектицидов	23
1.3 Контактное применение РНК-инсектицидов	27
1.3.1 Биodeградация РНК-инсектицидов	33
1.4 Преимущества инсектицидов на основе нуклеиновых кислот	36
1.4.1 Устойчивость к инсектицидам	38
1.4.2 Глобальное потепление	39
1.4.3 Снижение биоразнообразия	42
1.4.4 Увеличение токсической нагрузки на экосистемы	44
РАЗДЕЛ 2 УСЛОВИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	47
2.1 Место выполнения работы и задействованные в экспериментах насекомые ..	47
2.2 Дизайн и синтез олигонуклеотидов	49
2.3 Метод масс-спектрометрии	51
2.4 Применение ДНК-олигонуклеотидов на насекомых	53
2.5 Обработка химическими инсектицидами	54
2.6 Измерение массы насекомых	54
2.7 Гомогенизация тканей насекомых и экстракция РНК	55
2.8 Обратная транскрипция	55
2.9 ПЦР в реальном времени (анализ экспрессии генов)	55

2.10 Секвенирование ДНК	57
2.11 Детекция продуктов амплификации и спектрофотометрия	59
2.12 Анализ нуклеазной активности	60
2.13 Статистический анализ	60
РАЗДЕЛ 3 БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ НА ОСНОВЕ АНТИСМЫСЛОВЫХ ФРАГМЕНТОВ, КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ 28S РИБОСОМАЛЬНОЙ РНК И ITS2-УЧАСТКАМ ПРЕ-РРНК	62
3.1 Биологическая эффективность олигонуклеотидного инсектицида КОККУС-11 в отношении личинок мягкой ложнощитовки	62
3.2 Биологическая эффективность олигонуклеотидного инсектицида ЯВОЛ-11 в отношении личинок японской восковой ложнощитовки	67
3.3 Влияние олигонуклеотидного инсектицида ЯВОЛ-11 на концентрацию 28S рРНК в клетках личинок японской восковой ложнощитовки.....	69
3.4 Биологическая эффективность олигонуклеотидного инсектицида АВЖЕЧ-11 в отношении личинок австралийского желобчатого червеца	71
3.5 Влияние олигонуклеотидного инсектицида АВЖЕЧ-11 на концентрацию 28S рРНК в клетках австралийского желобчатого червеца.....	75
3.6 Биологическая эффективность олигонуклеотидных инсектицидов в отношении смешанной популяций насекомых-вредителей семейства Diaspididae	76
3.6.1 Биологическая эффективность олигонуклеотидных инсектицидов в отношении смешанной популяции насекомых-вредителей <i>D. britannicus</i> и <i>A.</i> <i>lauri</i> в полевых условиях	76
3.6.2 Влияние олигонуклеотидных инсектицидов на концентрацию 28S рРНК в личинках представителей семейства Diaspididae.....	83
3.6.3 Механизм действия олигонуклеотидных инсектицидов (механизм ДНК- сдерживания)	85
3.7 Биологическая эффективность олигонуклеотидного инсектицида БРИТ-11 в отношении личинок британской щитовки	88

3.8 Влияние олигонуклеотидного инсектицида БРИТ-11 на концентрацию 28S рРНК в клетках личинок британской щитовки	89
3.9 Биологическая эффективность олигонуклеотидных инсектицидов ЛАУРА-11 и АЛАКРИС-11 в отношении лавровой листоблошки	90
РАЗДЕЛ 4 СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ.....	96
4.1 Сравнительный анализ результатов применения олигонуклеотидных инсектицидов	96
4.2 Экономические перспективы внедрения олигонуклеотидных инсектицидов в защиту растений	98
4.2.1 РНК-инсектициды	98
4.2.2 Олигонуклеотидные инсектициды	100
РАЗДЕЛ 5 БИОРАЗЛАГАЕМОСТЬ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ, РАЗРАБОТАННЫХ К 28S РИБОСОМАЛЬНЫМ РНК ВРЕДИТЕЛЕЙ	104
5.1 Биоразлагаемость олигонуклеотидных инсектицидов с участием тканевых дезоксирибонуклеаз.....	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	113
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	115
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..	118
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120
ПРИЛОЖЕНИЯ	161
ПРИЛОЖЕНИЕ А. ОТЧЁТ О РЕЗУЛЬТАТАХ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО ИНСЕКТИЦИДА В ОТКРЫТОМ ГРУНТЕ ПРОТИВ ЛИЧИНОК <i>COCCUS HESPERIDUM</i> L. В ФГБУН «НБС-ННЦ» В 2020 ГОДУ..	162
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. ОТЧЁТ О РЕЗУЛЬТАТАХ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ В ОТКРЫТОМ ГРУНТЕ ПРОТИВ <i>TRIOZA ALACRIS</i> FLOR. В ФГБУН «НБС-ННЦ» В 2021 ГОДУ.	165

ПРИЛОЖЕНИЕ В. ОТЧЁТ О РЕЗУЛЬТАТАХ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО ИНСЕКТИЦИДА В ОТКРЫТОМ ГРУНТЕ ПРОТИВ <i>DYNASPIDIOTUS BRITANNICUS</i> NEWSTEAD В ФГБУН «НБС-ННЦ» В 2022 ГОДУ.....	169
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. ОТЧЁТ О РЕЗУЛЬТАТАХ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО ИНСЕКТИЦИДА В ОТКРЫТОМ ГРУНТЕ ПРОТИВ <i>ICERYA PURCHASI</i> MASK. В ФГБУН «НБС-ННЦ» В 2022 ГОДУ.....	172
ПРИЛОЖЕНИЕ Д. РЕЗУЛЬТАТЫ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТА ГЕНА 28S РРНК МЯГКОЙ ЛОЖНОЩИТОВКИ <i>COCCUS HESPERIDUM</i> L. (ОБНАРУЖЕННОЙ В ФГБУН «НБС-ННЦ»)..	175
ПРИЛОЖЕНИЕ Е. РЕЗУЛЬТАТЫ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТА ГЕНА 28S РРНК ЯПОНСКОЙ ВОСКОВОЙ ЛОЖНОЩИТОВКИ <i>CEROPLASTES</i> <i>JAPONICUS</i> GREEN (ОБНАРУЖЕННОЙ В ФГБУН «НБС-ННЦ»)..	176
ПРИЛОЖЕНИЕ Ё. РЕЗУЛЬТАТЫ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТА ГЕНА 28S РРНК АВСТРАЛИЙСКОГО ЖЕЛОБЧАТОГО ЧЕРВЕЦА <i>ICERYA PURCHASI</i> MASK. (ОБНАРУЖЕННОГО В ФГБУН «НБС-ННЦ»)..	177
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж. РЕЗУЛЬТАТЫ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТА ГЕНА 28S РРНК ЛАВРОВОЙ ЩИТОВКИ <i>AONIDIA LAURI</i> BOUCHE (ОБНАРУЖЕННОЙ В ФГБУН «НБС-ННЦ»)..	178
ПРИЛОЖЕНИЕ З. РЕЗУЛЬТАТЫ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТА ГЕНА 28S РРНК БРИТАНСКОЙ ЩИТОВКИ <i>DYNASPIDIOTUS BRITANNICUS</i> NEWSTEAD (ОБНАРУЖЕННОЙ В ФГБУН «НБС-ННЦ»)..	179

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Лавр благородный (*Laurus nobilis* L.) – это вечнозелёное дерево или кустарник, которое широко используется в сельском хозяйстве во многих странах мира (Paparella et al., 2022). На территории России лавр произрастает и возделывается в юго-западных районах Краснодарского края, в Крыму (Насухова и др., 2017). Данное растение выращивают как пряно-ароматическую и эфиромасличную культуру (Насухова и др., 2017; Paparella et al., 2022). Однако выращивание лавра может быть осложнено вредителями, такими как представители подотряда грудохоботных (*Sternorrhyncha*) отряда полужесткокрылых (*Hemiptera*), что снижает товарный вид и качество продукции. Данные насекомые-вредители являются фитофагами мелких размеров (Drohojowska et al., 2020) и переносчиками фитопатогенов, таких как вирусы растений (Payton et al., 2018; Gadhave et al., 2020; Misaka et al., 2020; Saurabh et al., 2021), имеющими большое экономическое и экологическое значение для сельского и лесного хозяйства. Основными вредителями лавра благородного являются такие виды как лавровая щитовка *Aonidia lauri* Bouche, британская щитовка *Dynaspidiotus britannicus* Newstead, мягкая ложнощитовка *Coccus hesperidum* L., японская восковая ложнощитовка *Ceroplastes japonicus* Green, лавровая белокрылка *Trialeurodes lauri* Sign. и лавровая листоблошка *Trioza alacris* Flor. (Трикоз, 2017), которые относятся к надсемействам кокцидовых (*Coccoidea*), белокрылковые (*Aleyrodoidea*) и псиллидам (*Psylloidea*) (Szwedo et al., 2016; Hardy et al., 2018; Drohojowska et al., 2020). Склонность к инвазии наряду с их узкоспециализированными морфологическими и физиологическими адаптациями делает данные виды грудохоботных проблематичными для сельскохозяйственных и лесных систем (Drohojowska et al., 2020). Вредоносность некоторых представителей грудохоботных обходится дорого, поскольку приводит к потере урожая от 50 до 100% (Navas-Castillo et al., 2011; Villanueva et al., 2014; Bowling et al., 2016; Saurabh et al., 2021; del Pino et al., 2021; Mwanauta et al., 2022).

В настоящее время для ограничения популяций на лавре благородном данных видов вредных фитофагов широко используются химические инсектициды (Трикоз, 2017; Sharma et al., 2019; Jaffar et al., 2022). К сожалению, использование большинства инсектицидов представляет угрозу для окружающей среды и здоровья человека (Grewal et al., 2017; Gagic et al., 2017; Klich et al., 2020; Kalyabina et al., 2021; Alengebawy et al. 2021; Pathak et al., 2022). Следует отметить, что эволюция химических инсектицидов от хлорорганических и фосфорорганических инсектицидов к неоникотиноидам и диамидам сопровождается появлением более высокой селективности действия инсектицидов (Umetsu et al., 2020). Однако современный уровень обеспечения продовольственной безопасности современными инсектицидами для сельскохозяйственных культур пока недостаточен, что побуждает к поиску новых классов инсектицидов.

Сегодня в качестве альтернативы химическим инсектицидам (Tien et al., 2018; Casida et al., 2018; Camacho-Pérez et al., 2022; Hodoşan et al., 2023; Du and Fu, 2023) и препаратам, разрабатываемым западными и отечественными учёными на основе двухцепочечной РНК – РНК-инсектицидам (Журавлев и др., 2022; Конарев, 2023; Долгих и др., 2025; Grizanova et al., 2021; Zhang et al., 2022; Pallis et al., 2023; Cedden et al., 2024; Narva et al., 2025), создаются препараты следующего поколения, действующим веществом которых являются немодифицированные антисмысловые ДНК-олигонуклеотиды – олигонуклеотидные инсектициды (олинциды) (Патент..., 2008; Oberemok et al., 2017; Oberemok et al., 2019а; Ниадар и Разо, 2019; Плугатарь и др., 2021; Новиков и др., 2022; Андреева и др., 2024; Useinov et al., 2020; Puzanova et al., 2023; Gavrilova et al., 2025). Позднее некоторые зарубежные учёные также подхватили данную идею и начали использовать как немодифицированные, так и модифицированные антисмысловые ДНК-олигонуклеотиды в практике защиты растений, а также для фундаментальных исследований на вредителях (Hunter et al., 2021; Sandoval-Mojica et al., 2021; Priti, Mukherjee et al., 2022). Данные инновационные препараты являются высокоэффективными, экологичными,

проявляют гибкость к устойчивости со стороны сайта-мишени вредителя, а их структура быстро биоразлагается (Oberemok et al., 2019a; Puzanova et al., 2023). Разработка и применение таких препаратов на основе нуклеиновых кислот позволит повысить продовольственную безопасность, в частности, нашей страны, а также вести органическое сельское хозяйство и получать органическую продукцию (Распоряжение Правительства РФ от 04.07.2023 N 1788-р (ред. от 08.05.2025)).

Степень разработанности темы исследования. Самые ранние научные работы посвящены олигонуклеотидным инсектицидам на основе антиапоптозных генов, нацеленным на мРНК. Такие инсектициды имеют длину 18–20 нуклеотидов (нт) и показали свою эффективность на личинках непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Erebidae) как зараженных, так и незараженных бакуловирусом (Патент..., 2008; Mutah and Adesoji, 2017; Oberemok et al., 2017). Начиная с 2019 года, было обнаружено, что подотряд грудохоботных отряда полужесткокрылых очень восприимчив к олигонуклеотидным инсектицидам длиной 11 нт. Мишенью для данных инсектицидов является рРНК вредителей (Useinov et al., 2020). Пре-рРНК и рРНК составляют 80% всех РНК в клетке (Warner, 1999), что делает их удобной мишенью для действия препаратов на основе антисмысловых олигонуклеотидов и позволяет существенно увеличить соотношение сигнал/шум до примерно $10^5:1$ по сравнению с использованием какой-либо случайной мРНК, которые суммарно составляют лишь 5% всех РНК. На сегодняшний день олигонуклеотидные инсектициды хорошо себя проявили, воздействуя на 18S рРНК мучнистого червеца *Pseudococcus viburni* Signoret (Новиков и др. 2022), митохондриальную 16S рРНК кровяной тли *Eriosoma lanigerum* Hausmann (Андреева и др., 2024) и внутренний транскрибируемый спейсер (ITS2) пре-рРНК хризантемовой тли *Macrosiphoniella sanborni* Gillette (Puzanova et al., 2023), вызывая гибель от 80 до 100% насекомых в течение 3-14 суток.

Несмотря на обширный экспериментальный материал и исследования, касающиеся проявления инсектицидных свойств контактных олинцидов,

мишенью для которых является рРНК гусениц непарного шелкопряда (Oberemok et al., 2019a), мучнистого червеца (Новиков и др., 2022) и тлей (Андреева и др., 2024; Puzanova et al., 2023), сведения относительно эффективности контактных олинцидов, нацеленных на 28S рРНК лавровой щитовки, британской щитовки, мягкой ложнощитовки, японской восковой ложнощитовки, австралийского желобчатого червеца и лавровой листоблошки, а также ITS2 *T. alacris*, отсутствуют. Особенно актуальным при использовании 28S рРНК в качестве мишени является то, что она наиболее длинная рРНК (~ 3900 нт) из всех рРНК в клетке и на ее основе можно создавать практически бесконечный репертуар олинцидов против вредителей из подотряда грудохоботных. Поэтому разработка эффективных и безопасных контактных олинцидов для снижения плотности популяций данных полифагов и снижения их вредоносности сельскохозяйственным культурам, таким как лавр благородный, является актуальной для повышения продовольственной безопасности в Российских регионах, в частности, Республике Крым.

Цель исследования – биологическое и экотоксикологическое обоснование разработки и применения новых контактных олигонуклеотидных инсектицидов для защиты растений в сельском и лесном хозяйствах с продвинутыми экологическими характеристиками (быстрая биоразлагаемость и избирательность в действии) против щитовок, ложнощитовок, гигантских червецов и псиллид.

Задачи исследования:

- установить биологическую эффективность применения олигонуклеотидных инсектицидов с учетом генетической изменчивости 28S рРНК отдельных популяций насекомых-вредителей;
- изучить избирательность действия олигонуклеотидных инсектицидов с применением нуклеотидных замен;
- определить особенности и специфичность действия олигонуклеотидных инсектицидов и контрольных ДНК-олигонуклеотидов на молекулярно-генетическом уровне на целевые организмы;
- оценить скорость биоразлагаемости олигонуклеотидных инсектицидов.

Научная новизна. Результаты диссертационной работы впервые продемонстрировали высокую биологическую эффективность и экологическую безопасность контактных олигонуклеотидных инсектицидов ЛАУРИ-11, БРИТ-11, КОККУС-11, ЯВОЛ-11, АВЖЕЧ-11 и АЛАКРИС-11, мишенью для которых являются 28S рРНК. Для ЛАУРА-11 мишенью является ITS2 пре-рРНК, на насекомых-вредителях из подотряда грудохоботных. На представителях подотряда грудохоботных впервые обнаружены некоторые паттерны механизма ДНК-сдерживания (ДНКс), состоящего из двух этапов: на первом этапе происходит остановка функции рРНК при помощи олигонуклеотидных инсектицидов, приводящая к гиперкомпенсации; на втором этапе происходит ферментативное расщепление рРНК с помощью РНКазы H. На примере олигонуклеотидного инсектицида БРИТ-11 показано, что замена одного нуклеотида в 1-й (5'-конец), 6-й и 11-й (3'-конец) позициях приводит к снижению его биологической эффективности. Получены новые знания, свидетельствующие о том, что для щитовок комплементарность 3'-концевого нуклеотида к целевой 28S рРНК наиболее важна для выраженного инсектицидного эффекта. Показано, что между олигонуклеотидными инсектицидами и несовершенными комплементарными участками 28S рРНК нецелевых насекомых-вредителей могут происходить неканонические спаривания оснований (известные и для других биологических систем), которые в итоге приводят к гибели насекомого, что должно учитываться при разработке избирательно действующих препаратов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в ходе выполнения лабораторных и полевых экспериментов результаты и выводы, заложили основу создания экологически оптимизированных препаратов и дают основания рекомендовать применение олигонуклеотидных инсектицидов против щитовок, ложнощитовок, гигантских червецов и псиллид для защиты сельскохозяйственных, лесных и декоративных растений (после их регистрации).

Методология и методы исследований. Выполнение поставленных задач стало возможным благодаря общепринятым методам молекулярной биологии, генетики, экологии, аналитической и органической химии. Основой методологии

данного исследования стали фосфорамидитный метод синтеза ДНК, ДНК-секвенирование и ПЦР-анализ в реальном времени.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Избирательный контроль с нанесением минимального вреда нецелевым организмам и снижением жизнеспособности целевых насекомых-вредителей (лавровая щитовка, британская щитовка, мягкая ложнощитовка, японская восковая ложнощитовка, австралийский желобчатый червец и лавровая листоблошка) происходит посредством контактного применения 1 мг/м² олигонуклеотидных инсектицидов на листья растений, содержащих вредителей.

2. В последовательности олигонуклеотидного инсектицида БРИТ-11 замена одного нуклеотида в 1-й (5'-конец), 6-й и 11-й (3'-конец) позициях приводит к снижению биологической эффективности олигонуклеотидного инсектицида БРИТ-11. Комплементарность 3'-концевого нуклеотида к целевой 28S рРНК наиболее важна для выраженного инсектицидного эффекта (значимость замен нуклеотидов для инсектицидного эффекта: 5' < (6) < 3').

3. Основным специфическим механизмом действия, приводящим к гибели клеток насекомых (личинки лавровой щитовки, британской щитовки, мягкой ложнощитовки, японской восковой ложнощитовки, австралийского желобчатого червца и лавровой листоблошки), является механизм ДНК-сдерживания. Механизм состоит из двух этапов: первый этап – гиперкомпенсация рРНК; второй этап – деградация рРНК при участии РНКазы H и запускается олигонуклеотидными инсектицидами ЛАУРИ-11, БРИТ-11, КОККУС-11, ЯВОЛ-11, АВЖЕЧ-11 и АЛАКРИС-11.

4. Разработанные олигонуклеотидные инсектициды против лавровой щитовки (ЛАУРИ-11), британской щитовки (БРИТ-11), японской восковой ложнощитовки (ЯВОЛ-11), австралийского желобчатого червца (АВЖЕЧ-11), обладают высокой скоростью биоразлагаемости.

Достоверности результатов исследований. Проведен большой объем полевых и лабораторных исследований. В работе применены стандартные статистические методы обработки и анализа полученных данных в программах

Microsoft Excel и Statistica, которые обеспечивают достоверность результатов и обоснованность выводов. Средние значения и их погрешности указаны в графиках и таблицах.

Публикации результатов исследований. Все представленные полученные результаты в диссертационной работе были описаны и опубликованы в 23 научных работах: 4 – в изданиях из рекомендуемого перечня ВАК РФ, 9 – в изданиях, входящих в международную базу данных Scopus и Web of Science, 1 патент, а также 9 работ по материалам научных конференций – в международных и отечественных журналах и сборниках.

Апробация результатов исследований. Основные положения диссертационного исследования обобщены и очно доложены, а также обсуждены на конференциях различного уровня: научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава, аспирантов, студентов и молодых ученых «Дни науки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского» (г. Симферополь, 2017 и 2018 гг.); XX Международном конгрессе по защите растений (г. Афины, 2024 г.); X Всероссийской научно-практической конференции «Инновационные направления и методы исследований в области генетики, биотехнологии, селекции, семеноводства, размножения и защиты сельскохозяйственных, садовых и лесных древесных растений» (г. Ялта, пгт. Никита, 2024 г.); XII Международной научно-практической конференции «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем» (г. Краснодар, 2024 г.); XI Всероссийской научно-практической конференции «Инновационные методы исследования в области генетики, биотехнологии, селекции, семеноводства, лесоагротелиорации и защиты растений» (г. Ялта, пгт. Никита, 2025 г.); Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Инновационные технологии и технические средства для АПК» (г. Воронеж, 2025 г.).

Личный вклад автора. Соискателем разработаны схемы проводимых исследований. Автором проведён аналитический обзор данных международных и отечественных литературных источников, выполнены лабораторные и полевые

исследования, проведена статистическая обработка данных, обобщение и анализ полученных данных, сформированы выводы, опубликованы основные положения работы, а также подготовлены диссертация и автореферат.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 179 страницах, проиллюстрирована 25 рисунками, содержит 9 таблиц, 9 приложений. Работа состоит из введения, 5 разделов, заключения, включающее выводы и практические рекомендации. Проанализировано 323 источника, которые входят в список литературы, из них 304 – на английском языке.

Благодарность. Автор выражает глубокую признательность за руководство диссертационной работой своему научному руководителю В.В. Оберемку, д.б.н., заведующему кафедрой общей биологии и генетики «КФУ имени В.И. Вернадского».

Работа была частично поддержана грантом РФФИ № 22–16–20052 «Разработка олигонуклеотидных инсектицидов для защиты растений против насекомых-вредителей из подотряда Грудехоботные (отряд Полужесткокрылые) на основе коротких антисмысловых олигонуклеотидов рибосомальных генов».

РАЗДЕЛ 1 ИНСЕКТИЦИДЫ НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В СЕЛЬСКОМ И ЛЕСНОМ ХОЗЯЙСТВАХ (АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В последнее время устойчивый и экологичный подход к защите растений в сельском и лесном хозяйствах привёл к появлению множества новых идей, среди которых инсектициды на основе нуклеиновых кислот. Олигонуклеотидные инсектициды (контактно вводимая антисмысловая ДНК-биотехнология – КВАДб) и РНК-инсектициды (технология двухцепочечной РНК) являются средствами борьбы с вредителями с различными механизмами действия, которые могут дополнять инсектицидный потенциал друг друга в борьбе с насекомыми-вредителями из разных отрядов и могут присутствовать вместе в комплексных двухкомпонентных препаратах. Физиология насекомых показывает, что контактный способ доставки таких контролирующих агентов весьма перспективен, позволяя избежать встречи с нуклеазами в пищеварительном тракте. Будущее КВАДб и технологии двухцепочечной РНК перспективно: два природных молекулярно-генетических механизма борьбы с насекомыми-вредителями на защите растений с минимальным вредом для нецелевых организмов. Как экологически чистые технологии, основанные на использовании инсектицидов с новым действующим веществом ДНК и РНК, могут существенно улучшить состояние окружающей среды.

1.1 Современные методы борьбы с вредителями: опыт применения олигонуклеотидных инсектицидов и РНК-инсектицидов

Продовольственная безопасность и качество продуктов питания сегодня являются серьезными проблемами во всем мире, ставя на первый план развитие инноваций в сельском хозяйстве. Класс насекомых является самой распространённой таксономической группой на планете (Rolff et al., 2019; Yoon et al., 2023) и одной из самых больших угроз для сельскохозяйственных

культур. Благодаря разнообразию адаптационных механизмов (маскировка, жизненный цикл и размер тела) практически нет такого континента, на котором бы не было насекомых-вредителей (Prasad, 2022). Биологические особенности насекомых позволяют им, с одной стороны, выступать в роли сельскохозяйственных вредителей, наносящих значительный ущерб различным критически важным культурам (Belluco et al., 2023), а с другой стороны, они незаменимые опылители (Nurul Huda et al., 2015; Prado et al., 2020). Также они являются важными звеньями в пищевых цепочках, значимыми участниками процесса почвообразования, и даже в последнее время некоторые насекомые стали неотъемлемым источником белка при производстве продуктов питания для человека (Sogari et al., 2023). В связи с этим сектор защиты растений неизменно вынужден совершенствоваться в разработке новых экометодов и препаратов для регулирования популяций вредных насекомых.

Развитие препаратов с инсектицидными свойствами начиная от первых упоминаний применения далматской ромашки и заканчивая диамидами описывается в литературе как успехами, так и проблемами в борьбе с вредителями (Pirali-Kheirabadi and Razzaghi-Abyaneh, 2007; Cresswell, 2014; Shahrajabian et al., 2021). Трудности обычно связаны с устойчивостью к инсектицидам (South and Hastings, 2018; Hancock et al., 2018; Namias et al., 2021). В настоящее время становится ясно, что в составе новых инсектицидов должны быть в первую очередь молекулы природного происхождения, которые не только доступны, безопасны и эффективны, но и обладают многолетней полезностью (Rezende-Teixeira et al., 2022; Khursheed et al., 2022; Araújo et al., 2023). Такие свойства препаратов позволяют им стать наиболее востребованными на мировом рынке инсектицидов.

В последние годы в высокорейтинговых журналах и на международных конференциях всё больше внимания уделяется методам контроля в защите растений на основе нуклеиновых кислот (Oberemok et al., 2019a; Meitha et al., 2021; Hu et al., 2022). Эти методы способны объединить преимущества современных инсектицидов и способствовать обеспечению продовольственной

безопасности и повышению качества продуктов питания. Речь идёт об ДНК-программируемой защите растений на основе платформы контактно вводимой антисмысловой ДНК-биотехнологии (КВАДб), а также о технологии РНК-интерференции (РНКи). Основой КВАДб являются олигонуклеотидные инсектициды (или олинциды – одноцепочечная антисмысловая ДНК) с новым механизмом действия – механизм ДНК-сдерживания (ДНКс) (Oberemok et al., 2024a; Oberemok et al., 2024b). Основной технологии РНКи являются РНК-инсектициды (двухцепочечная РНК, или дцРНК) (Shaffer, 2020).

Инсектициды на основе нуклеиновых кислот могут быть доставлены в клетки насекомых-вредителей различными путями. Разработаны такие подходы, как генетическая модификация (ГМ) растений, введение ДНК и РНК через пероральное кормление и контактные методы доставки инсектицидов (Ghosh et al., 2018). ГМ-растения не пользуются большим доверием общества и стоят дорого. Устойчивость к ГМ-растениям развивается постепенно, и проблемы устойчивости не могут быть решены быстро (Tabashnik et al., 2013; Tabashnik and Carrière, 2017; Head et al., 2017). Такой подход не является гибким и обычно требует применения химических инсектицидов (Bøhn and Lovei, 2017), арсенал которых обширен. Поэтому, учитывая потенциальный вред нецелевым культурам, ученые пришли к выводу, что необходима тщательная оценка экологических рисков от использования генетически модифицированных растений (Bauer-Panskus et al., 2020). Следует отметить, что текущее понимание того, как развивается устойчивость к дцРНК у насекомых, какие параметры отвечают за нецелевые эффекты дцРНК и как растения, животные и насекомые подвергаются воздействию дцРНК в окружающей среде, далеко от полного (Roberts et al., 2015; Khajuria et al., 2018; Mishra et al., 2021).

В 2006 году были опубликованы одни из первых данных исследований, показавших, что насекомые-вредители чувствительны к пероральному введению дцРНК (Araujo et al., 2006; Turner et al., 2006). Для пути доставки посредством перорального кормления основным препятствием являются нуклеазы. Довольно сложно представить ситуацию, при которой определенное сочетание азотистых

оснований в ДНК и РНК уменьшало бы восприимчивость к ДНКазам и РНКазам, хотя исключения могут быть возможны. Однако в природе в подавляющем большинстве случаев ДНК и РНК растений попадают в пищеварительные тракты насекомых во время кормления, перевариваются и питают организм вредителя, а не убивают его. Сила нуклеаз может варьироваться от отряда к отряду (Almeida et al., 2017; Guan et al., 2018; Peng et al., 2018), но общая картина останется неизменной. Слабое инсектицидное действие ГМ-растений также объясняется тем, что их действие наблюдается в кишечнике насекомых-вредителей, где нуклеазы снижают их эффективность (Peng et al., 2018). Отмечается, что эти соображения в первую очередь касаются немодифицированных нуклеиновых кислот, которые наиболее распространены в природе и обеспечивают безопасность экосистемы. Для модифицированных нуклеиновых кислот (например, фосфоротиоатов) (Howard et al., 2022) проницаемость, биоразлагаемость и избирательность действия могут существенно различаться, что увеличивает риск нецелевых эффектов.

Подавляющее большинство изобретенных химических инсектицидов действуют контактным путем, хотя часто для них имеет место пероральный путь (Oberemok et al., 2015a; Mulé et al., 2017; Stejskal et al., 2021). Успех большинства химических инсектицидов контактным и пероральным путями объясняется тем, что это синтетические молекулы, для которых нет эффективных предусмотренных природой механизмов биodeградации в клетках. Однако они постепенно появляются в ходе микроэволюции вредителя, вырабатывая устойчивость к инсектицидам. При контактном пути доставки инсектицидов решающую роль играет проницаемость покровов насекомого (Locke, 1965) и его клеток. Нуклеиновые кислоты справляются с этими барьерами. Однако даже в случае контактного применения нуклеазы, присутствующие в эпителиальных клетках, снизят инсектицидный эффект, хотя и в меньшей степени, чем в кишечнике насекомых-вредителей (Peng et al., 2018).

Если для введенной в клетку нуклеиновой кислоты существует процесс (каскад биохимических реакций), конкурирующий с деградацией нуклеазой, то

амплитуда инсектицидного эффекта для инсектицидов на основе нуклеиновых кислот будет зависеть от длины введенной нуклеотидной последовательности, ее концентрации, а также от выбранного в качестве мишени гена. Иными словами, для деградации целевой РНК вредителя необходимо подобрать оптимальные условия для запуска механизма ДНКс через платформу КВАДб (Oberemok et al., 2024a) или РНКи через технологию дцРНК (Christiaens et al., 2020) (Рисунок 1).

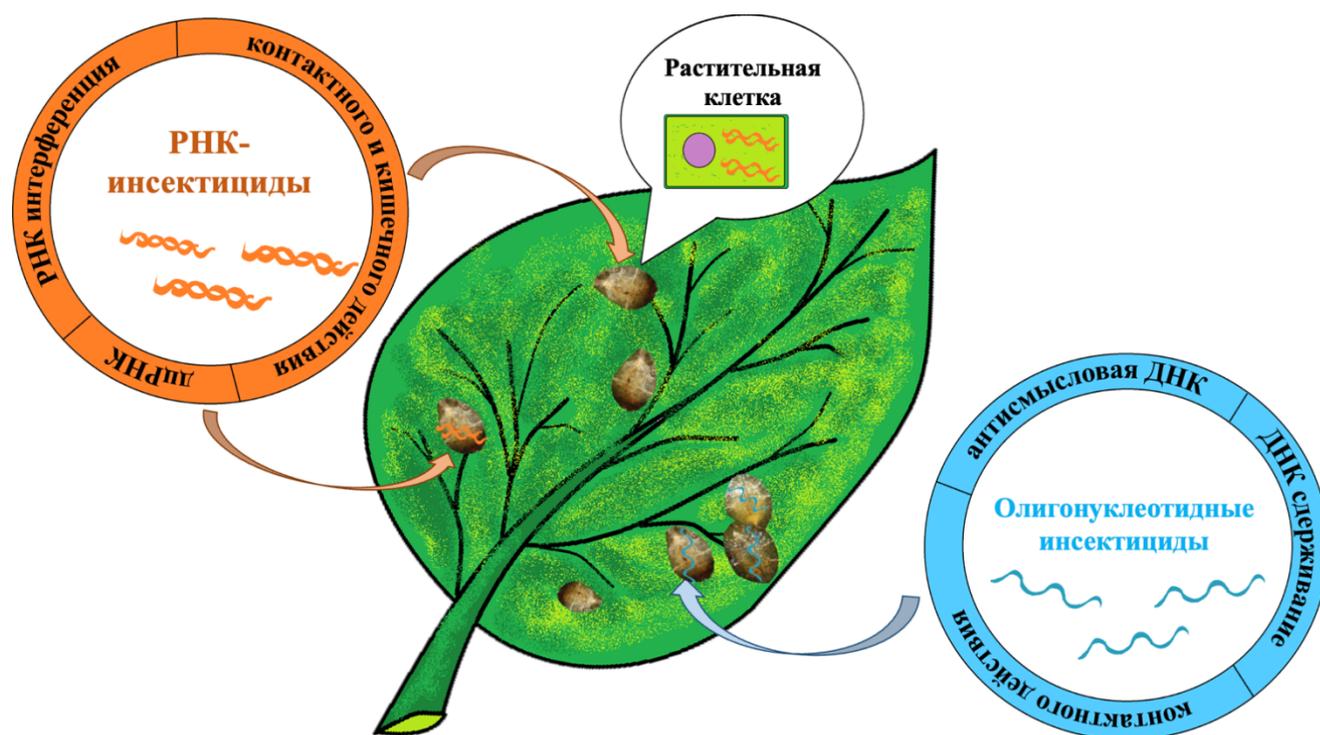


Рисунок 1 – Способ действия инсектицидов на основе нуклеиновых кислот. РНК-инсектициды и олигонуклеотидные инсектициды

1.2 Ключевые изменения в направлении контактно вводимой антисмысловой ДНК-биотехнологии (КВАДб)

Знак равенства между ДНК-олигонуклеотидами и контактными инсектицидами был впервые установлен в 2008 году на непарном шелкопряде *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Erebidae) (Патент..., 2008; Oberemok et al., 2017, Oberemok et al., 2019a). Исследования показали, что разрушение целевой мРНК происходит в ответ на инсектициды, основанные на антисмысловых ДНК-олигонуклеотидах, которые рекрутируют отвечающий за данный процесс

фермент РНКазу H (Dias and Stein, 2002; Xu et al., 2016). Первые олигонуклеотидные инсектициды длиной 18–20 нт на основе антиапоптотических генов показали свою эффективность на гусеницах непарного шелкопряда, не содержащих вирус и инфицированных вирусом ядерного полиэдроза (Oberemok et al., 2017; Nyadar and Adeyemi, 2018; Oberemok et al., 2018a; Boukouvala et al., 2022).

В 2019 году были внесены три ключевых изменения для существенного улучшения КВАДб. Олигонуклеотидные инсектициды открыли совершенно новое измерение защиты растений, основанное на мощной и селективной ДНК-программируемой борьбе с насекомыми-вредителями. Во-первых, в качестве мишени для олигонуклеотидных инсектицидов стала использоваться рРНК насекомых *L. dispar* из отряда чешуекрылых (Oberemok et al., 2019a). Пре-рРНК и рРНК составляют 80% всех РНК в клетке (Warner, 1999), что делает их удобной мишенью для действия препаратов на основе антисмысловых олигонуклеотидов и позволяет существенно увеличить соотношение сигнал/шум до примерно 100 000:1 по сравнению с использованием только мРНК, которая составляет лишь 5% всех РНК. Рибосомальная РНК у насекомых, как и у других эукариот, представлена двумя типами: ядерной (5S, 5,8S, 18S и 28S рРНК) и митохондриальной (12S и 16S рРНК). Данное структурное разнообразие рРНК создаёт дополнительные возможности для целенаправленного проектирования олигонуклеотидных инсектицидов – можно разрабатывать последовательности, специфичные для определённых субъединиц рРНК, что повышает селективность воздействия на целевые виды насекомых-вредителей при минимальном влиянии на сопутствующие организмы. Взаимодействие между целевой рРНК и олинцидом напоминает механизм молнии, выполняемый дуплексом ДНК-РНК (метод «генетической застёжки-молнии») (Рисунок 2). Суть данного механизма заключается в формировании стабильного гибрида между антисмысловой ДНК-последовательностью инсектицида и комплементарным участком рРНК насекомого. Образующийся дуплекс блокирует ключевые этапы биогенеза рибосом, нарушая синтез белка и проводя к гибели клеток насекомого-вредителя.

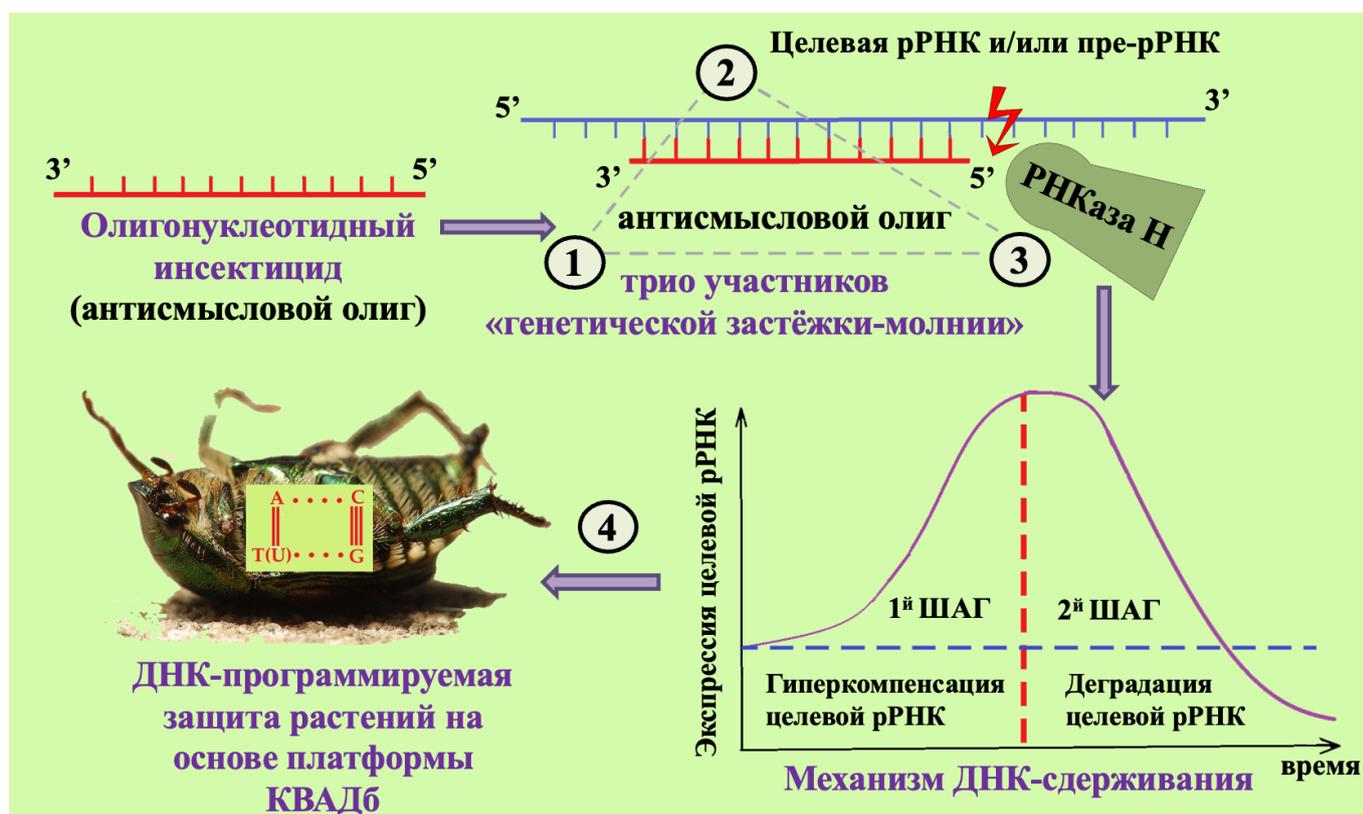


Рисунок 2 – Ключевые особенности метода «генетической застёжки-молнии» (ДНК–рРНК-дуплекс, образованный олигонуклеотидным инсектицидом и целевой последовательностью рРНК и/или пре-рРНК насекомого:

- 1 – короткая немодифицированная антисмысловая ДНК как инсектицид;
- 2 – рРНК и/или пре-рРНК как целевая молекула;
- 3 – ДНКс как механизм действия;
- 4 – видоспецифичный инсектицидный эффект

Уменьшение длины олигонуклеотидных инсектицидов от 10 до 12 нт стало вторым изменением. В силу особенностей фосфорамидитного метода синтеза ДНК такое решение способствовало снижению стоимости при производстве, а также обеспечило высокой уникальностью олигонуклеотиды в $1/4,19 \cdot 10^6$ для большинства агроценозов, в которых насчитывается небольшое количество доминирующих видов различных насекомых (Oberemok et al., 2024a). Тем не менее, в зонах с десятками различных видов, например, в парках, допустимо увеличение длины олигонуклеотидных инсектицидов.

Переход от изучения немодифицированных антисмысловых олигонуклеотидов на насекомых из отряда чешуекрылых (Oberemok et al., 2015b; Oberemok et al., 2017; Oberemok et al., 2019a) к представителям из подотряда

грудохоботных отряда полужесткокрылых стал третьим важным изменением, поскольку они проявили высокую восприимчивость (Oberemok et al., 2024a). Олигонуклеотидные инсектициды хорошо себя проявили воздействуя на следующие мишени: 18S рРНК мучнистого червеца *P. viburni* (Новиков и др., 2022), митохондриальную 16S рРНК кровяной тли *E. lanigerum* (Андреева и др., 2024; Oberemok et al., 2025a), внутренний транскрибируемый спейсер (ITS2) пре-рРНК хризантемовой тли *Macrosiphoniella sanborni* и хвойных тлей (*S. pineti*, *C. pinea*, *E. rileyi*) (Puzanova et al., 2023; Oberemok et al., 2024b), а также ITS2 паутинного клеща *Tetranychus urticae* (Gavrilova et al., 2025), показывающие потенциал для дальнейшего изучения и разработки олигонуклеотидных акарицидов. Как правило, после однократной контактной обработки насекомых-вредителей, питающихся соком, олигонуклеотидными инсектицидами в концентрации 100 нг/мкл наблюдается гибель от 80 до 100% насекомых, начиная с 3-х по 14-е сутки (Oberemok et al., 2024a).

1.2.1 Предпосылки к контактному применению олигонуклеотидных инсектицидов

Из литературных данные известно, что органохлорины и некоторые контактные инсектициды способны растворяться в кутикуле насекомых, несмотря на их хорошо развитый эпикутикулярный слой (Li et al., 2021). Изучено, что сложные молекулы растворённых веществ проникают через гидрофобную кутикулу насекомых медленнее, чем молекулы простых веществ, а неполярные молекулы – быстрее, чем полярные (Watson et al., 2017; Bello et al., 2022). Градиент концентрации пенетранта является одним из основных движущих факторов процесса проникновения вещества через кутикулу (Watson et al., 2017; Bello et al., 2022). Было отмечено, что инсектициды, находящиеся в восковом слое, легко проникают в тело насекомого через наиболее проницаемые участки кутикулы (Webb and Green, 1945). Участки, которые служат «портами входа» для растворов, включают межсегментарные мембраны и тонкие зоны эпикутикулы

над нервными окончаниями (Mannino et al., 2019). Хитин, обладающий способностью абсорбировать органические молекулы, играет важную роль в проникновении пестицидов через кутикулу. Исследования с использованием очищенного хитина показали его высокую эффективность в поглощении пестицидов из водной смеси (Li et al., 2021). Предполагается, что отчасти олигонуклеотидные инсектициды эффективны против щитовок, поскольку они содержат многочисленные дыхальцевые поры, преоперкулярные поры, простые поры (Kondo and Watson, 2022), которые, очевидно, обеспечивают более глубокое проникновение ДНК-олигонуклеотидов. Например, основной путь попадания пиретроидов в организм насекомых проходит через дыхальца (Sugiura et al., 2008; Sumita et al., 2016). Однако для олигонуклеотидных инсектицидов все еще остро стоит вопрос, как они попадают в клетку, поскольку общепризнано, что доставка в определенные ткани ограничена такими факторами, как внутриклеточный трафик, деградация в биологических жидкостях и транспортировка через клеточные барьеры (Juliano et al., 2014). В некоторых исследованиях показано, что олигонуклеотиды могут попадать в клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза (Ming, 2011; Klabenkova et al., 2021) и путем активного транспорта (Loke et al., 1989; De Diesbach et al., 2000; Sun et al., 2019). Тем не менее, за более чем 25 лет исследований применения антисмысловых технологий гибель насекомого через подавление его целевых генов считается признаком проникновения нуклеиновых кислот в клетки насекомых-вредителей (Terenius et al., 2011; Xu et al., 2016; Oberemok et al., 2019a).

В недавних экспериментах было показано, что немодифицированные антисмысловые олигонуклеотиды проникают в клетки насекомых через их покровы после местного нанесения (Oberemok et al., 2019b), а также запускается механизм ДНКс (Oberemok et al., 2024b), рекрутируя фермент РНКазу H и подавляя активность целевого гена в большинстве случаев (Oberemok et al., 2017; Oberemok et al., 2019a; Useinov et al., 2020). В работе Oberemok et al. (2019b) было обнаружено, что в ответ на контактно введенные ДНК-фрагменты в клетках насекомых может происходить образование новых веществ. Кроме того,

использование олигонуклеотидных инсектицидов приводит к изменениям в тканях насекомых. Более того, многочисленные исследования активности дезоксирибонуклеаз из гомогенатов насекомых и растений показали, что олигонуклеотидные инсектициды быстро деградируют (Oberemok et al., 2019a; Puzanova et al., 2023, Oberemok et al., 2025a). Поэтому трудно представить, что они могут действовать через пероральное питание, когда и растительные, и насекомые нуклеазы контактируют со своим прямым субстратом – короткой немодифицированной антисмысловой ДНК. Предполагается, что контактная доставка немодифицированной антисмысловой ДНК намного эффективнее пероральной доставки немодифицированной антисмысловой ДНК из-за активных ДНКаз, присутствующих в пищеварительном тракте.

1.2.2 Биodeградация олигонуклеотидных инсектицидов

Деградация нуклеиновых кислот в основном зависит от абиотических факторов (температура воды, pH, соленость и ультрафиолетовое излучение) и биотических факторов (микробы и активность внеклеточных ферментов) (Barnes et al., 2016). Хорошо известно, что большинство бактерий поглощают внеклеточную ДНК, используя внеклеточные ферменты в поисках питательных веществ в водных экосистемах. Активные ферменты, которые разрушают внеклеточную ДНК, были обнаружены во фракциях отфильтрованной воды, содержащей бактерии, водоросли, цианобактерии, грибы, а также одноклеточных и многоклеточных планктонных животных (Siuda et al., 2001; Mauvisseau et al., 2022).

Например, внеклеточная ДНКаза, продуцируемая *P. aeruginosa*, обеспечивает деградацию внеклеточной ДНК в доступный источник углерода, азота и фосфата (Mulcahy et al., 2010). Было показано, что все члены группы А *Streptococcus* производят, по крайней мере, одну внеклеточную ДНКазу, а большинство штаммов производят более одного отдельного фермента (Cunningham, 2000; Allan et al., 2020). Кроме того, деградация, вероятно, связана с

геномными характеристиками: целевой областью, длиной фрагмента, геномным происхождением (ядерным или митохондриальным) и составом нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) (Barnes et al., 2016; Siuda et al., 2001). Однако исследования нуклеазной активности в гомогенатах тканей целевых насекомых-вредителей (*L. dispar*, *Leptinotarsa decemlineata* Say) и их растений-хозяев (*Quercus pubescens*, *Solanum tuberosum*) показали, что большинство используемых олигонуклеотидов разрушаются в течение 24 ч. при температуре 27°C (Oberemok et al., 2018b; Oberemok et al., 2019a); а ДНКазы *M. sanborni* разрушают их еще быстрее, в течение 1 ч. (Puzanova et al., 2023).

Недавние результаты продемонстрировали замечательную специфичность действия олигонуклеотидных инсектицидов (Oberemok et al., 2019a) и показали их безопасность для нескольких нецелевых организмов: *Q. robur*, *Malus domestica* (Zaitsev et al., 2015), *Triticum aestivum* (Oberemok et al., 2013; Nyadar et al., 2019), *Manduca sexta*, *Agrotis ipsilon* (Oberemok et al., 2015b), *Galleria mellonella* (Oberemok et al., 2019a).

Более того, в некоторых научно-исследовательских работах было отмечено, что достаточно заменить один нуклеотид в последовательности олигонуклеотидного инсектицида, чтобы существенно снизить его эффективность, в свою очередь, это свидетельствует о высокой селективности действия (Oberemok et al., 2019a; Puzanova et al., 2023). Преимущество использования природных олигомеров – немодифицированных антисмысловых олигонуклеотидов, по-видимому, заключается в самом безопасном способе контроля насекомых, поскольку клетки всех живых организмов содержат вездесущие нуклеазы, которые могут их нейтрализовать (Oberemok et al., 2019a). Следовательно, для олигонуклеотидных инсектицидов нет необходимости искать методы ускоренной биодegradации.

Принцип использования олигонуклеотидных инсектицидов заключается в том, что они должны иметь достаточно времени для действия в нужном месте и на нужный организм до их быстрой биодegradации. У химических инсектицидов фактор времени не имеет значения, так как они обладают устойчивой химической

структурой, позволяющей действовать не только в нужном месте, но и на целевые и нецелевые организмы. Таким образом, при использовании немодифицированных антисмысловых фрагментов ДНК, а также двуцепочечных фрагментов РНК, в клетках насекомых будет конкуренция между различными типами нуклеаз за субстрат, в основном между экзонуклеазами и нуклеазами, направляемыми РНК- и ДНК-гидами (Рисунок 3).

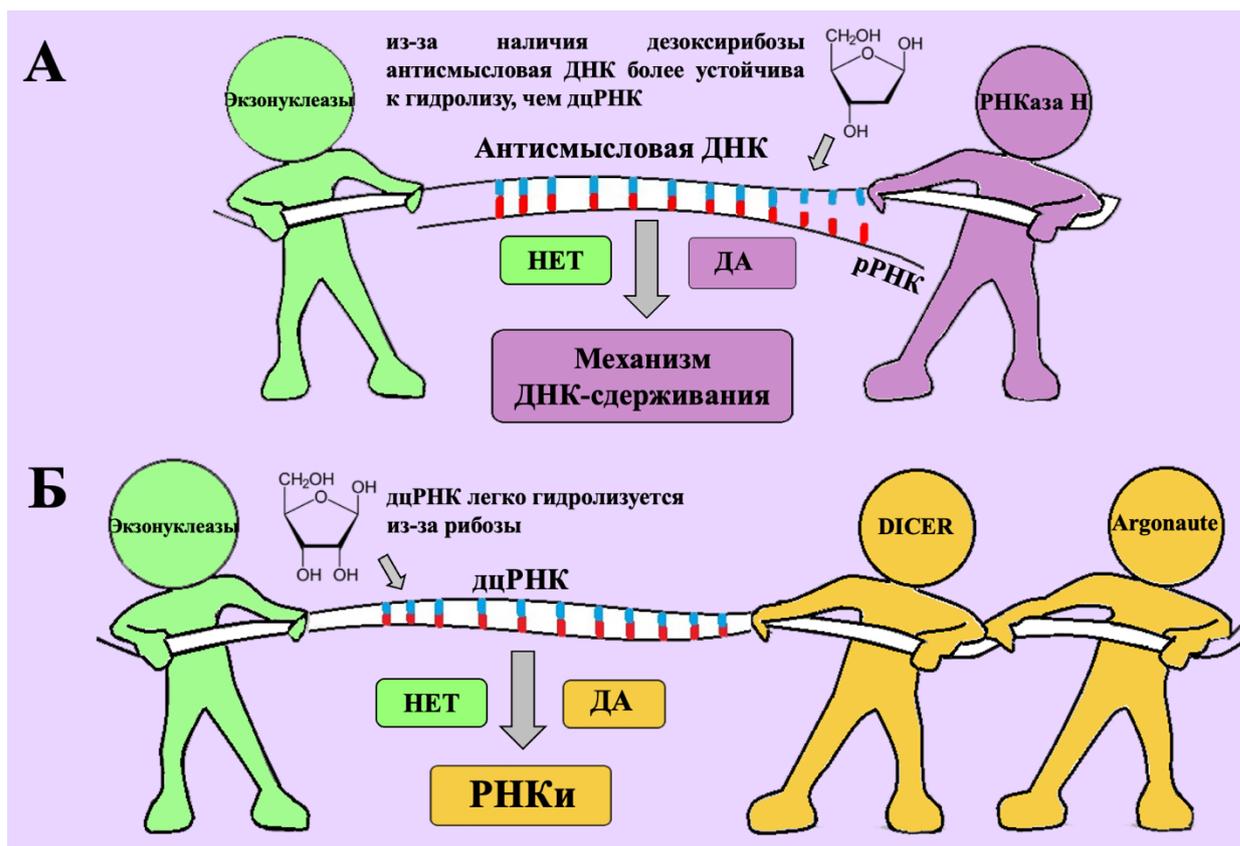


Рисунок 3 – Конкуренция между экзонуклеазами и эндонуклеазами, а также нуклеазами, управляемыми нуклеиновыми кислотами, за их субстраты:
 (А) экзонуклеазы против РНКазы Н, направляемой ДНК-гидом;
 (Б) экзонуклеазы против эндонуклеазы DICER и Argonaute, направляемой РНК-гидом

Тем не менее, олигонуклеотидные инсектициды достаточно активны в действии против грудохоботных и демонстрируют успешное разрушение целевой рРНК в комплексе «олигонуклеотидный инсектицид/рРНК» благодаря активности РНКазы Н, что обеспечивается высокой концентрацией целевой рРНК в клетке насекомого (Oberemok et al., 2024a).

Кроме того, в отсутствие нуклеаз ДНК менее подвержена гидролизу в окружающей среде и клетках насекомых, чем молекулы РНК, из-за отсутствия атома кислорода в дезоксирибозе в 2'-положении (Thorpe, 2000). Данный химический параметр дает большую возможность и время антисмысловой ДНК, а не дцРНК подействовать до того, как она будет деградирована.

Сегодня в области защиты растений существует понимание необходимости создания родо- и видоспецифичных инсектицидов, которые могли бы решать проблемы с глобально значимыми насекомыми-вредителями, такими как *I. purchasi*, *Diaphorina citri*, *Aphis gossypii*, *Planococcus citri* и др. Если олигонуклеотидные инсектициды не станут панацеей, то существенным достижением для защиты сельскохозяйственных культур станет достижение эффективного контроля нескольких десятков экономически важных видов насекомых-вредителей. Олигонуклеотидные инсектициды имеют легко адаптируемую структуру и избирательный механизм действия, что открывает возможность эффективной и продуманной борьбы с вредителями с минимально возможным экологическим риском. Инновационная стратегия борьбы с вредителями с использованием хорошо «подшитых» коротких олигонуклеотидов открывает новые горизонты «олигоинсектицидов» (Patil et al., 2024) и ДНК-программируемой защиты растений как передовой технологии.

1.3 Контактное применение РНК-инсектицидов

В 1998 году Э. Файр и К. Мелло обнаружили, что основной противовирусной иммунной системой круглого червя *Caenorhabditis elegans* является механизм посттранскрипционного подавления генов, известный сегодня как РНКи (Fire et al., 1998). РНК-интерференция – это механизм посттранскрипционного подавления генов с использованием двуцепочечной РНК-копии (обычно >200 п.н.) целевого гена (Tomoyasu et al., 2008; Svoboda, 2020).

Данный механизм широко изучался для применения в сельском хозяйстве, особенно в борьбе с вредителями, путем подавления основных генов насекомых для контроля популяций вредителей. Путь миРНК состоит из двух ветвей: экзогенного пути миРНК (экзо-миРНК), который обеспечивает защиту от вирусных инфекций, и эндогенного пути миРНК (эндо-миРНК), отвечающего за подавление транспозонов в геноме (Zhu and Palli., 2020). Путь экзо-миРНК часто используется в экспериментальных условиях посредством введения дцРНК для подавления определенных генов (Cooper et al., 2019; Cooper et al., 2021). Процесс начинается, когда дцРНК попадает в клетку либо естественным путем, либо через внешнее введение. Фермент Dicer, член семейства РНКазы III, распознает и расщепляет дцРНК на короткие фрагменты, известные как миРНК, обычно длиной 21–25 нуклеотидов (Vogel et al., 2019). Затем эти миРНК включаются в комплекс подавления экспрессии, индуцированный РНК (RISC), где белки Ago при содействии белков, связывающих дцРНК, таких как R2D2 или loquacious, играют решающую роль (Tomari et al., 2007; Hynes and Kakumani, 2024) (Рисунок 4).

Комплекс RISC выбирает одну цепь миРНК, известную как направляющая цепь, в то время как другая цепь, называемая пассажирской цепью, деградирует. Направляющая цепь направляет RISC на распознавание и связывание с комплементарными последовательностями мРНК внутри клетки (Matranga et al., 2005; Matranga and Pyle, 2010). После связывания белок Ago, особенно в его домене PIWI, расщепляет целевую мРНК, что приводит к ее

деградации и предотвращает трансляцию в белки. Ферменты DICER, особенно у животных, демонстрируют относительно низкое разнообразие (Sioud, 2021).

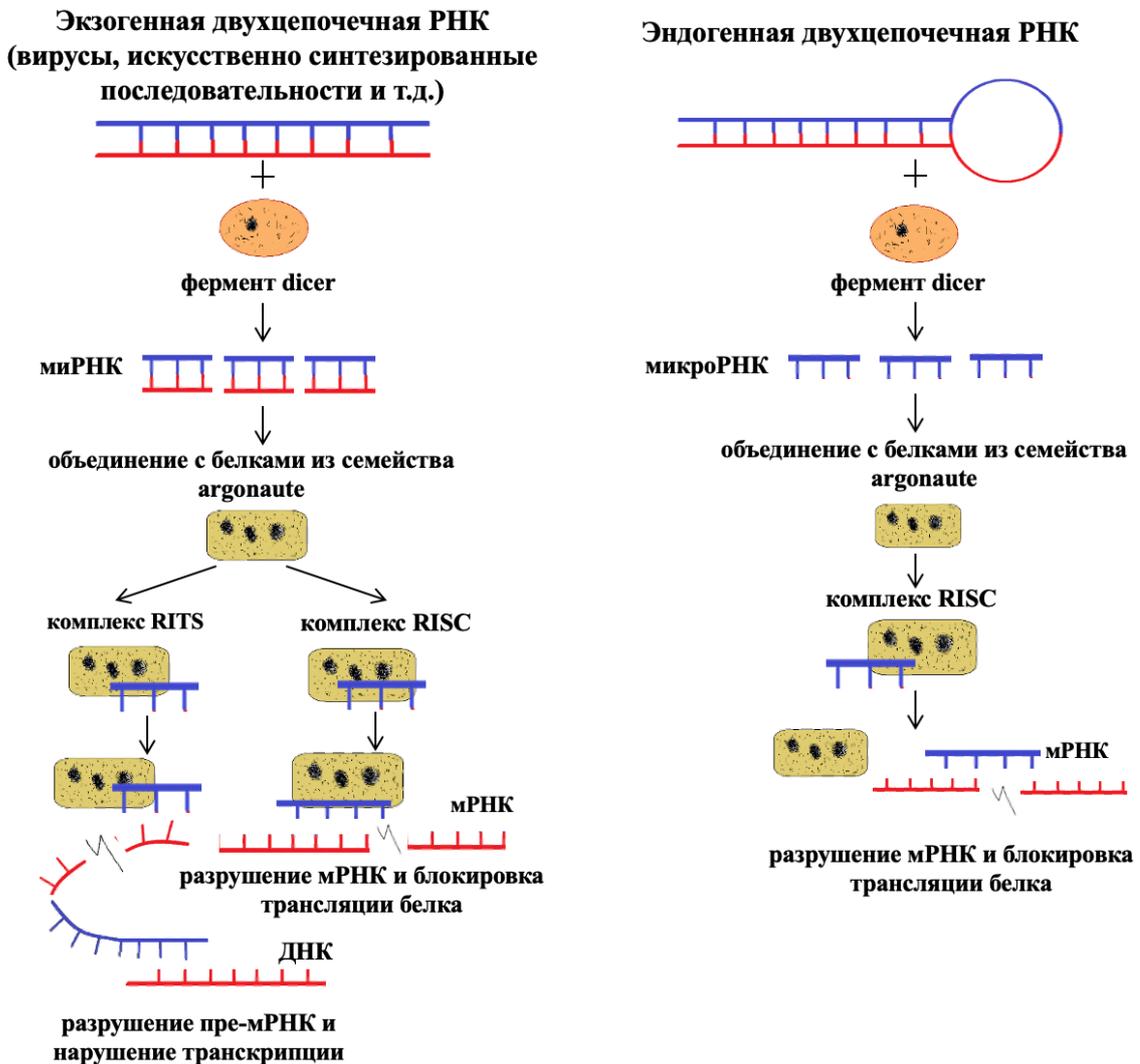


Рисунок 4 – Схема РНК-индуцируемого комплекса выключения генов у насекомых

Данные ферменты принадлежат к семейству РНКазы III и играют ключевую роль в обработке длинных дцРНК, расщепляя эти приблизительно 21 нуклеотид (Treiber et al., 2019). Ферменты, подобные DICER, содержат два домена РНКазы III, которые позволяют расщеплять обе цепи РНК, оставляя характерные двухнуклеотидные 3'-выступы из-за их специфического расположения на дцРНК (Treiber et al., 2019; Koo and Palli, 2024). РНКи является высокоэффективным и системным методом у жесткокрылых насекомых (Powell et al., 2017; Rodrigues et al., 2017a; Rodrigues et al., 2017b). Насекомые, принадлежащие к

отрядам Orthoptera и Blattodea, обычно демонстрируют эффективный ответ РНКи (Irles et al., 2013; Santos et al., 2014; Li et al., 2021; Hoang et al., 2022). Эффективность РНКи варьируется у перепончатокрылых и полужесткокрылых (Yoshiyama et al., 2013; Christiaens et al., 2014; Guo et al., 2018; Jain et al., 2020; Jain et al., 2021). Насекомые Lepidopteran и Dipteran обычно имеют более низкую эффективность РНКи (Miller, 2008; Terenius et al., 2011; Christiaens et al., 2018). В связи с этим высокая изменчивость эффективности РНКи среди экономически важных насекомых ограничивает разработку биопестицидов на основе РНКи и их применение в защите растений.

Некоторое время среди ученых считалось, что первое исследование в данной области было представлено в работе Pridgeon et al. (2008), где было продемонстрировано успешное использование дцРНК, растворённых в ацетоне, для воздействия на популяции комаров *Aedes aegypti*, что приводило к значительной гибели взрослых самок насекомых (посредством подавления экспрессии гена IAP-1) (Pridgeon et al., 2008). Однако впоследствии, после получения новых данных, многие учёные пришли к выводу, что их предыдущие результаты были недостаточно обоснованы и интерпретированы неверно (Puglise et al., 2015; Pridgeon et al., 2016).

Поэтому исследование Wang et al. (2011) стало первым, в котором фрагменты контактной дцРНК успешно применялись для активации РНКи с целью уничтожения насекомых-вредителей в защите растений. Результаты данного исследования Wang et al. (2011) демонстрируют, что ингибирование экспрессии определённых генов (например, гена химотрипсина) приводит к смерти гусениц *Ostrinia furnacalis* при контактном воздействии дцРНК, растворённой в воде. Позднее Zhang et al. (2015) показали результаты с типичной системной РНКи в фенотипах, которые приводили к аномальной линьке личинок и куколок после использования дцРНК, нацеленной на три функциональных домена (M, N и C) гена запасного белка, богатого метионином, *O. furnacalis*. Они также предоставили четкие доказательства того, что дцРНК можно использовать для разработки видоспецифичных биоинсектицидов широкого спектра действия и

что 21-нуклеотидная миРНК действительно оказывает заметное нецелелевое воздействие, когда не выбраны консервативные гены или сегменты генов (Zhang et al., 2015).

Результаты El-Shesheny et al. (2013), Killiny et al. (2014), Santos-Ortega и Killiny (2018) показывают, что при местном применении дцРНК может проникать в кутикулу *D. citri* и индуцировать РНКи. Также было показано, что контактная доставка дцРНК эффективна в индукции подавления генов и смертности гороховой тли (*Acyrtosiphon pisum*) (Killiny et al., 2014). Исследования Zheng et al. (2019) и Niu et al. (2019) продемонстрировали потенциал с формулой наноноситель/дцРНК/детергент. Препарат проникает через стенку тела в гемоцель, а затем в течение 1 часа распространяется в различные ткани соевой тли *Aphis glycines*. Доставленная дцРНК эффективно подавила экспрессию целевого гена с высоким нокдаун-эффектом (95,4%), а популяция тли была в значительной степени подавлена (80,5%).

Как правило, интернализация дцРНК в клетке происходит после преодоления начальных барьеров деградации в окружающей среде (Christiaens et al., 2020). Два различных потенциальных механизма захвата дцРНК – это захват, опосредованный трансмембранными каналами у *C. elegans*, и захват, опосредованный эндоцитозом (или клатрин-зависимый эндоцитоз), показанный в клетках *Drosophila* S2 (Yu et al., 2012). Роль Sid-подобных трансмембранных каналов в захвате дцРНК была впервые описана у нематоды *C. elegans* (Feinberg and Hunter, 2003; Jose and Hunter, 2007; Winston et al., 2007; Whangbo and Hunter, 2008). Впоследствии гены, Sid-подобные, были также идентифицированы у *Lepidoptera*, *Hemiptera* и *Coleoptera*, но их роль в клеточном поглощении до сих пор не была напрямую доказана (Tomoyasu et al., 2008; Xu et al., 2013; Cappelle et al., 2016; Pinheiro et al., 2018), в то время как клатрин-зависимый эндоцитоз, по-видимому, играет важную роль в поглощении дцРНК у многих насекомых (Saleh et al., 2006; Xiao et al., 2015; Cappelle et al., 2016; Pinheiro et al., 2018).

Какие виды насекомых подходят для местного применения РНКи, пока неизвестно, и необходимы интенсивные исследования процедуры поглощения дцРНК стенкой тела и генов, участвующих в процессе получения дцРНК и запуска реакции РНКи (Niu et al., 2019). По сравнению с используемыми в настоящее время методами доставки дцРНК, микроинъекцией и приемом внутрь, контактный способ является наиболее эффективным по времени и затратам, что может существенно повлиять на исследования функциональных генов на основе РНКи и выбор потенциальных генов-кандидатов для разработки стратегий контроля насекомых на основе РНКи в будущем.

Исходя из сказанного выше, заключается, что система искусственного индуцирования РНК-интерференции (SIGS, spray-induced gene silencing – спрей-индуцированный сайленсинг генов) вызывает подавление генов. Данная технология недавно приобрела большую популярность в защите растений от насекомых-вредителей (Rank and Koch, 2021). Кроме того, SIGS может воздействовать на вредителей через контактный путь доставки (Wang et al., 2011; El-Shesheny et al., 2013; Killiny et al., 2014; Zhang et al., 2015; Santos-Ortega and Killiny, 2018; Niu et al., 2019; Zheng et al., 2019). После прёима внутрь молекул дцРНК успешный ответ РНКи зависит от множества факторов (например, длины и концентрации дцРНК, целевого гена, вида членистоногого и стадии развития), включая стабильность дцРНК в кишечнике (на которую влияют водородный показатель (рН) кишечника и нуклеазы) (Katoch et al., 2013; Kunte et al., 2020). Водородный показатель кишечника важен, поскольку он влияет на стабильность поглощенных молекул дцРНК. Поскольку РНК наиболее стабильна при рН от 4,0 до 5,0, слегка кислая средняя кишка Coleoptera и Hemiptera (рН около 5) сохраняет дцРНК стабильной. С другой стороны, стабильность низкая в щелочном кишечнике Orthoptera, Diptera и Hymenoptera и, в частности, в сильнощелочном кишечнике Lepidoptera (рН более 8,0) (Cooper et al., 2019). При этом рН 4–5, очевидно, является оптимальным для функционирования нуклеаз в кишечнике Coleoptera (Almeida et al., 2017), в то время как слюнные железы Hemiptera играют решающую роль в переваривании нуклеиновых кислот (Lomate

and Bonning, 2016). Таким образом, вероятно, неважно, что данный рН является оптимальным для стабильности дцРНК, и в итоге дцРНК будет успешно деградировать (по крайней мере, частично) РНКазы в различных частях пищеварительного тракта насекомых-вредителей. Например, активность нуклеазы была в целом высокой в слюнных железах и низкой в областях средней кишки как у взрослых особей, так и у нимф полужесткокрылого вредителя *Nezara viridula* (Cantón and Bonning, 2019). В связи с тканеспецифическими и ферментными проблемами, возникающими при использовании РНКи, могут возникнуть трудности. В связи с этим контактный способ доставки нуклеиновых кислот остаётся наиболее предпочтительным, так как он исключает возможность их переваривания в таких местах, как пищеварительный тракт.

Тем не менее данный метод доставки ограничен для дцРНК, поскольку насекомые (преимущественно жесткокрылые) имеют толстую кутикулу (Balabanidou et al., 2018). При этом были установлены насекомые, предпочитающие прятаться в частях растений, где распыление дцРНК невозможно. Более того, переход от лаборатории к полю потребует дальнейшей разработки дцРНК для повышения стабильности (ультрафиолетовое излучение дождь), поскольку рибоза усиливает гидролиз РНК (Thorp, 2000); специфичность (риски нецелевого воздействия) в условиях окружающей среды также требует оптимизации. Инсектициды на основе РНК и олигонуклеотидные инсектициды обладают уникальными свойствами, которые делают их перспективными препаратами нового поколения.

1.3.1 Биодegradация РНК-инсектицидов

Calantha™ – первый распыляемый биопестицид на основе дцРНК и на данный момент единственный, который поступил в продажу, выпущенный компанией Green Light Biosciences в 2023 году через 25 лет после открытия РНКи, для борьбы с колорадским жуком (Rodrigues et al., 2021; Pallis et al., 2023, GreenLight Biosciences, 2025). дцРНК быстро разрушается как в почве, так и в водной среде (Dubelman et al., 2014; Bachman et al., 2020; Mogilicherla et al., 2023). Например, исследователи Fischer et al. (2016) продемонстрировали, что несформулированная дцРНК обычно быстро разрушается в водных системах из-за микробной активности и гидролиза. В исследовании, проведенном Fischer et al. (2016), авторы отмечают, что время деградации для значений 50% (ДТ₅₀) и 90% (ДТ₉₀) в водной системе составляет менее трёх и четырех суток, соответственно.

Исследование аэробной водной деградации для Calantha™ зафиксировало значения ДТ₉₀, (6,18 и 4,2) суток, и значения ДТ₅₀, (1,87 и 1,27) суток, для двух репрезентативных водных сред (Fischer et al., 2016). Исследование аэробной деградации сельскохозяйственных почв для Calantha™ показало, что деградируется 80% дцРНК от начальной концентрации для всех протестированных почв (ЕРА, 2024). Быстрая деградация возможна из-за микробных нуклеаз и ультрафиолетового излучения, присутствующих в почве и на листьях. Более того, сток от росы и дождя также может значительно ограничить доступность дцРНК для вредителей (Parker et al., 2019; Bachman et al., 2020).

Например, *Staphylococcus aureus* использует РНК из окружающей среды в качестве строительного материала в специфических полисахарид-зависимых биопленках (Chiba et al., 2022); *Streptococcus pneumoniae* имеет внеклеточную нуклеазу EndA, которая разрушает как ДНК, так и РНК (Gonzalez et al., 2022); *S. pyogenes* может разрушать как одноцепочечную ДНК, (оцДНК) так и

двухцепочечную ДНК, а также РНК благодаря активно продуцируемым ими внеклеточным нуклеазам (Remington et al., 2018).

Исследования нуклеазной активности *Spodoptera litura* показали, что голая дцРНК (414 п.н. в концентрации 0,05 мкг/мкл) разрушается сывороточными нуклеазами за 30 мин, а нуклеазы слюны практически полностью разрушают дцРНК за 2 ч. (Peng et al., 2018). Высокая скорость деградации дцРНК (от двух до трёх ч.) также наблюдалась у тли *Acyrtosiphon pisum* (Christiaens et al., 2014) и табачной гусеницы-бражника *M. sexta* (Garbutt et al., 2013). Ученые пытаются решить данную проблему с помощью усовершенствований и недавних открытий в области химии и нанотехнологий, чтобы воспрепятствовать биодеградации дцРНК неспецифическими РНКазами в клетках насекомых (например, использование дцРНК-защитных агентов, поверхностно-активных веществ и наночастиц) (Lucena-Leandro et al., 2022; Ma et al., 2024). К сожалению, такие решения могут привести к более неожиданным негативным последствиям для окружающей среды. Некоторые исследователи показали, что совместное подавление гена *ZcdsRNase1* (дцРНКазы) вместе с геном *ZcCOP1-альфа*, который играет важную роль в развитии и выживании насекомых, улучшило эффективность РНКи у *Zeugodaus cucurbitae* (привело к 84% смертности личинок) (Ahmad et al., 2024).

Критически важным вопросом при оценке персистенции дцРНК в образцах окружающей среды является метод обнаружения дцРНК. До сих пор используемые методы основывались на зондовых анализах (Quantigene), которые не очень чувствительны или точны. Для достижения данной цели требуется создание более чувствительных методик, включая ОТ-ПЦР, для выявления двухцепочечной РНК в сочетании с секвенированием для обнаружения малых РНК (примерно 20 нт). Данные малые РНК могут накапливаться как промежуточные продукты деградации двухцепочечной РНК, оставаясь незамеченными стандартными методами обнаружения, но сохраняя свой биологический потенциал для РНКи (Dalakouras et al., 2024).

Существует общее мнение, что путем тщательного выбора длины и последовательности дцРНК (Chen et al., 2012) РНКи может быть ограничена целевыми насекомыми-вредителями без каких-либо прямых вредных эффектов для нецелевых видов, включая полезных насекомых, таких как опылители и агенты биологического контроля (Zotti et al., 2018; Cagliari et al., 2019). Однако ожидание того, что дцРНК будет иметь высокую специфичность, можно опровергнуть двумя аргументами (Aroga et al., 2021). Во-первых, восприимчивость РНКи к гетерологичной дцРНК может быть получена с помощью одной соответствующей последовательности из 21 нт, но требует нескольких или многих соответствующих 21-меров в дцРНК. При этом РНКи может быть достигнута с помощью всего лишь 15 комплементарных оснований и может быть толерантной к некоторым несовпадениям последовательностей, которые различаются в зависимости от вида насекомого, гена и концентрации дцРНК (Powell et al., 2017; Chen et al., 2021). Во-вторых, животные, включая насекомых, могут реагировать на дцРНК неспецифическим для последовательности образом, т.е. независимо от последовательности дцРНК. В частности, различные исследования показали, что дцРНК без комплементарных последовательностей длиной от 15 до 21 нт в геноме насекомого может оказывать существенное влияние на противовирусный иммунитет, экспрессию генов и метаболизм у насекомых (Powell et al., 2017; Chen et al., 2021; Brutscher et al., 2017; Flenniken and Andino, 2013; Hirai et al., 2004; Chen et al., 2024; Joga et al., 2021).

Более того, «Организация экономического сотрудничества и развития» опубликовала два руководящих документа по биоразлагаемости дцРНК-пестицидов и их общей оценке риска для окружающей среды (OECD, 2020). Помимо нецелевых эффектов для нецелевых организмов и проблем с окружающей средой, неизученный риск дцРНК-пестицидов заключается в том, что они могут приводить к эпигенетическим эффектам в сельскохозяйственных культурах, при этом индуцированные эпимутации могут наследоваться через

поколение (Dalakouras et al., 2020; Dalakouras et al., 2021). Поэтому очевидно, что необходимы дальнейшие исследования в данном направлении.

1.4 Преимущества инсектицидов на основе нуклеиновых кислот

Технологии, основанные на использовании нуклеиновых кислот, пока не стали панацеей в защите растений, но всё же имеют ряд уникальных преимуществ для устойчивого сельского хозяйства. Олигонуклеотидные инсектициды и инсектициды на основе РНК являются инсектицидами с различными способами действия, и вполне возможно, что они будут дополнять инсектицидный потенциал друг друга в борьбе с вредителями из разных отрядов. Например, КВАДб эффективна против полужесткокрылых (Oberemok et al., 2024a), но оказывает умеренное инсектицидное действие на жесткокрылых (Oberemok et al., 2018b), в то время как технология двухцепочечной РНК эффективна против жесткокрылых (Christiaens et al., 2020), но оказывает умеренное инсектицидное действие на полужесткокрылых (Cooper et al., 2019). Такие препараты могут осуществлять совместное воздействие, будучи объединены в сложные контактные препараты. Можно предположить, что олигонуклеотидные инсектициды и инсектициды на основе РНК будут эффективны и найдут свою нишу в отдельных отрядах, а способ доставки будет играть огромную роль. Очевидно, что пероральное кормление будет подходить для некоторых насекомых-вредителей в пределах отдельного отряда, а контактное применение будет подходить для других насекомых из того же отряда. Для малоподвижных насекомых-вредителей контактное применение будет более удобным, в то время как доставка пероральным кормлением будет лучше для скрытных насекомых.

Однако чем больше насекомых-вредителей будет обработано этими технологиями на основе нуклеиновых кислот, тем более устойчивым и экологически чистым будет мировое сельское хозяйство. Также возможно создание комбинированных препаратов для защиты растений, включающих молекулы оцДНК и дцРНК. Технологии производства таких препаратов *in vitro*

становятся всё более доступными, что вскоре превратит КВАДб и технологию двухцепочечной РНК в реальные продукты. Благодаря достижениям в системах производства дцРНК стоимость синтеза дцРНК заметно снизилась с 12 000 долл. США/г до менее 0,5 долл. США/г (Cagliari et al., 2019; Suhag et al., 2020; Taning et al., 2020). Себестоимость оцДНК с использованием жидкофазного синтеза, согласно расчетам, составляет около 5–10 долл. США/г. Некоторые формуляции олигонуклеотидных инсектицидов для отдельных видов могут быть доступны уже сегодня. Например, специальная формуляция олигонуклеотидных инсектицидов против хвойных тлей обходится в 0,5–1 долл. США/га (Oberemok et al., 2024b). Олигонуклеотидные инсектициды и инсектициды на основе РНК, представляющие собой инсектицидные препараты нового поколения, могут стать востребованными на рынке современных средств защиты растений после прохождения сертификации во многих сельскохозяйственных странах.

Агентство по охране окружающей среды США (EPA), Европейское агентство по безопасности пищевых продуктов (EFSA) и Австралийское агентство по пестицидам и ветеринарным препаратам (APVMA) использовали существующие нормативные базы для сельскохозяйственных химикатов, биохимических пестицидов и средств защиты растений в качестве основы для оценки пестицидных нуклеиновых кислот соответственно. Кроме того, на встрече, организованной Организацией экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), был разработан набор рекомендаций по оценке риска экзогенно вводимых продуктов нуклеиновых кислот (OECD, 2020). С ростом интереса рынка к пестицидам на основе нуклеиновых кислот разработка гармонизированной нормативной базы будет способствовать процессу коммерциализации (He et al., 2022).

1.4.1 Устойчивость к инсектицидам

В настоящее время нет традиционных химических инсектицидов, к которым насекомые не могли бы выработать устойчивость, что создаёт серьёзную экологическую проблему, затрудняет улучшение методов контроля популяций насекомых и стимулирует непрерывное создание новых средств контроля (Weston et al., 2013). Известно довольно много различных механизмов, с помощью которых насекомые обеспечивают развитие устойчивости к инсектицидам (Siddiqui et al., 2023). Механизмы устойчивости насекомых к инсектицидам обычно делятся следующим образом: поведенческая устойчивость (Nansen et al., 2016), затраты на приспособленность, связанные с устойчивостью к инсектицидам (Kliot and Ghanim, 2012), устойчивость к проникновению (Ngumbi et al., 2020), устойчивость к целевому участку (Venkatesan et al., 2022; Valmorbidia et al., 2022), метаболическая устойчивость (Venkatesan et al., 2022; Jaffar et al., 2022) и эксплуатационные факторы, вызывающие устойчивость (Sarwar and Salman, 2015; Subramanyam and Hagstrum, 2018). Одним из наиболее изученных и важных механизмов устойчивости у различных насекомых является устойчивость к целевому участку. В результате изменений в структуре или доступности целевого участка токсиканты больше не могут образовывать с ним устойчивые связи, явление, известное как десенсибилизация целевого участка (Venkatesan et al., 2022). Например, тля выработала устойчивость к пиретроидам посредством развития нокдаун-резистентности (Valmorbidia et al., 2022).

Несоответствия между инсектицидами на основе нуклеиновых кислот и целевой мРНК или рРНК, вызванные мутациями генов или полиморфизмами, могут способствовать развитию резистентности. Насекомые могут стать устойчивыми к РНКи, что также препятствует захвату клетками дцРНК. Кроме того, возможным механизмом развития резистентности является подавление или мутация генов, связанных с генами в пути РНКи. Например, у *L. decemlineata* Staufen C белок, связывающий дцРНК, необходимый для процессинга дцРНК, экспрессировался на более низких уровнях в клетках, устойчивых к РНКи, чем в

клетках, чувствительных к РНКи (Sarwar and Salman, 2015). Было обнаружено, что популяция *L. decemlineata* более чем в 11 100 раз устойчива к дцРНК, нацеленной на ген субъединицы A V-АТФазы, после девяти эпизодов селекции с использованием нетрансгенной доставки путем покрытия листьев (Mishra et al., 2021). В частности, устойчивость, вызванную мутациями целевого гена, можно легко снизить, используя оцДНК и дцРНК, нацеленные на другой участок гена или ген, что также является одним из уникальных преимуществ пестицидов на основе РНК и ДНК против устойчивости вредителей (Oberemok et al., 2018a; He et al., 2022). Следует отметить, что для олигонуклеотидных инсектицидов будет легче воссоздать эффективную последовательность, чем для более длинных дцРНК после возникновения устойчивости к целевому сайту. В случае устойчивости к целевому сайту новые олинциды можно легко воссоздать, сместив целевой сайт влево или вправо от сайта устойчивости к олинциду целевой рРНК (Oberemok et al., 2024a).

Необходимо подчеркнуть, что использование последовательностей из консервативных регионов генов вредителей помогает замедлить генетические механизмы (рекомбинация, амплификация генов, мутации и т. д.), которые способствуют развитию резистентности к инсектицидам. Это обусловлено тем, что в стабильных сегментах гена мутации происходят гораздо реже, что снижает частоту изменений в целевых участках мРНК или рРНК (Sharma et al., 2014).

1.4.2 Глобальное потепление

Недавние исследования эволюционной генетики инвазивных видов показали, что способность адаптироваться к естественному отбору (включая повышение температур) может быть более важна для успешной инвазии некоторых интродуцированных видов, чем широко распространенная физиологическая пластичность или толерантность к пестицидам. Следовательно, это может непреднамеренно увеличить эволюционный потенциал инвазивных видов и обеспечить их быстрый рост и географическое распространение в районе

интродукции (Lavergne and Molofsky, 2007; Siddiqui et al., 2021; Hafeez et al., 2022; Siddiqui et al., 2023).

Также было установлено, что высокие температуры вызывают вспышки численности вредителей, связанных с инсектицидами (Crossley et al., 2024). По некоторым оценкам, насекомые-вредители ответственны за 20% потерь урожая в мире (Sharma et al., 2017). Устойчивость насекомых-вредителей к большому количеству обычно используемых инсектицидов является основной причиной таких потерь сельскохозяйственных культур (Tabashnik et al., 2013; Zhu et al., 2016). Например, белокрылки стали более многочисленными в ландшафтах с большим использованием инсектицидов, но только когда температуры были относительно теплыми. Таким образом, изменение климата и воздействие инсектицидов могут спровоцировать вспышку численности насекомых-вредителей.

Эти многочисленные проблемы усиливают необходимость лучшего понимания связей между климатом, использованием инсектицидов и появлением и управлением новыми сельскохозяйственными вредителями. Инсектициды на основе нуклеиновых кислот характеризуются низким уровнем выбросов углекислого газа. Традиционные подходы к жидкофазному и твёрдофазному синтезу нуклеиновых кислот, которые включают использование фосфорамидитов на синтезаторах ДНК/РНК, характеризуются проведением синтетического цикла олигонуклеотидов в бескислородной среде с ацетонитрилом и катализаторами (Таблица 1). Аналогично, методы бесклеточного биосинтеза, такие как бесклеточное производство двухцепочечной РНК (cell-free dsRNA production) (Taning et al., 2020; Vilkhovoy et al., 2020), не сопровождаются выделением парниковых газов, включая оксид азота, метан и диоксид углерода (Patent..., 2016; Guidebook for the synthesis of oligonucleotides, 2024). Недавно предложенный биокаталитический процесс также обещает массовое производство олигонуклеотидов без выбросов парниковых газов, что делает данный подход перспективным с точки зрения экологии (Moody et al., 2023). Производство химических инсектицидов в отличие от синтеза нуклеиновых кислот, напротив,

сопровождается значительными выбросами парниковых газов, которые способствуют глобальному потеплению, что приводит к увеличению популяции вредителей (Heimpel et al., 2013; Cech et al., 2022; Rosa and Gabrielli, 2023; PAN, 2025).

Таблица 1 – Сравнение выбросов углекислого газа (CO₂), связанного с производством реагентов для синтеза олигонуклеотидных инсектицидов и неоникотиноидов (на примере тиаметоксама)

Инсектициды	Соединение	Реагенты и растворители	Соотношение тCO ₂ /т производства инсектицидов	Ссылка
Синтез олигонуклеотидных инсектицидов (олинцидов) на твердофазном носителе на автоматическом ДНК-синтезаторе не приводит к выбросам углекислого газа				
Олигонуклеотидный инсектицид	Антисмысловый олигонуклеотид	Амидиты, тетразол, 1-метиимидазол, уксусная или пропионовая кислота, трихлоруксусная кислота, дихлорметан, ацетонитрил	~0	Patent..., 2016; Guidebook for the synthesis of oligonucleotides, 2024
Синтез часто используемых хлортиазольных неоникотиноидных инсектицидов приводит к выбросам углекислого газа				
Хлортиазол	Тиаметоксам	S-метил-N-нитроизотиомочевина, метиламин, N-метил-N'-нитрогуанидин, формальдегид, муравьиная кислота, тетрагидро-1,3,5-оксадиазин, 2-хлор-5-хлорметиазол, диметилформамид, карбонат калия	0,351	(Patent..., 2009)

1.4.3 Снижение биоразнообразия

Стремительное сокращение биоразнообразия и накопление химических веществ в сельскохозяйственных продуктах (Grewal et al., 2017) является результатом продолжительного использования пестицидов, негативно воздействующего на окружающую среду (Gagic et al., 2017; Klich et al., 2020; Kalyabina et al., 2021). В связи с этим сохранение биоразнообразия и удовлетворение мирового спроса на продукты питания являются важными приоритетами XXI века (Bradshaw et al., 2016).

Уникальное общеевропейское исследование показало, что использование пестицидов является ответственным фактором снижения биоразнообразия растений, насекомых и птиц (Geiger et al., 2010). Недавний обзор определил химическое загрязнение, включая пестициды, как второй по значимости фактор снижения популяций насекомых во всем мире (Sánchez-Bayo and Wyckhuys, 2019).

Другие исследования показывают, что инсектициды и пестициды могут косвенно влиять на насекомых и других членистоногих: использование инсектицидов в сельском хозяйстве часто приводит к последующим вспышкам вредителей из-за уничтожения естественных врагов. Потеря флористического разнообразия и пищевых ресурсов из-за использования гербицидов может привести к сокращению популяций опылителей и естественных врагов вредителей сельскохозяйственных культур (Sánchez-Bayo, 2021). Пестициды могут вызывать такие нарушения, резко сокращая популяции хищников, паразитов и патогенов, которые контролируют зарождающихся вредителей (Cohen et al., 1994; Geiger et al., 2010).

Известно, что токсичность инсектицидов связана с множеством факторов, включая температуру, влажность, свет и pH (fJegede et al., 2017; Zou et al., 2018), а глобальное потепление обязательно приведет к вспышкам вредителей (Mao et al., 2019). Давно известно, что температура является критическим фактором, лежащим в основе токсичности инсектицидов (Scott, 1995), включая

колебания суточной или сезонной температуры (Petar et al., 2009). На положительные температурные коэффициенты влияют следующие инсектициды: фосфорорганические, карбаматные и неоникотиноидные (Satpute et al., 2007), а пиретроиды, напротив, демонстрируют отрицательную связь с испытуемыми температурами (Camp and Buchwalter, 2016).

Джеймс Д. Датчер считает, что возрождение насекомых и клещей происходит, когда обработка инсектицидами или акарицидами уничтожает популяцию вредителей и убивает, раздражает или иным образом контролирует естественных врагов вредителей (Dutcher, 2007). Остаточная активность инсектицида затем исчезает, и популяция вредителей может расти быстрее и достигать больших размеров. Примером может служить коричневая цикадка, которая является основным вредителем риса в Азии. Расширение ее ареала обусловлено синдромом адаптации к постоянному присутствию сельскохозяйственных химикатов (инсектицидов и фунгицидов) за последние 40 лет (You et al., 2016).

Учитывая, что Организация Объединенных Наций (ООН) объявила это десятилетие Десятилетием ООН по восстановлению экосистем (включая биоразнообразие), наступает период объединения методов биоконтроля, улучшающих охрану природы, с использованием пестицидной технологии на основе нуклеиновых кислот (Willow et al., 2022).

К сожалению, роль РНКи в защите биоразнообразия заключается в экологических проблемах, связанных как с трансгенными методами, так и с распылением. Хотя оценка риска дцРНК все еще находится в стадии концептуальной разработки (Arpaia et al., 2020; Rodrigues and Petrick, 2020; Romeis and Widmer, 2020), результаты проведенных оценок риска дцРНК (Bachman et al., 2013; Pampolini and Rieske, 2020; Castellanos et al., 2022; Hollowell and Rieske, 2022) предполагают, что нецелевое подавление генов в предпочтительно узком диапазоне видов может представлять собой наихудший сценарий. Отсутствие высококачественных и доступных последовательностей в настоящее время препятствует надежной защите нецелевых организмов. Однако

крайне важно использовать имеющиеся в настоящее время транскриптомы, представляющие уникальные таксономические линии, в качестве шаблонов для создания видоспецифичных дцРНК, и впоследствии изучить чувствительность этих таксонов к РНКи (Willow et al., 2022). Потенциальное воздействие дцРНК на нецелевые организмы трудно предсказать, поскольку были охарактеризованы геномы и/или транскриптомы относительно небольшого числа видов. Кроме того, риск активации иммунных реакций IFN у некоторых беспозвоночных, таких как медоносная пчела *Apis mellifera* (Flenniken and Andino, 2013), является основным фактором, который следует учитывать при оценке риска для нецелевых организмов (Willow et al., 2022).

В эпоху стремительного развития геномики биоинформатический анализ становится ключевым инструментом для достижения специфических целей в разработке оцДНК и дцРНК. Однако технологии КВАДб и РНК не могут обеспечить полное решение для глобальной продовольственной безопасности и сохранения агробιοразнообразия. Тем не менее, их интеграция открывает новые перспективы для повышения эффективности защиты урожая.

Особенно важно отметить, что использование олигонуклеотидных инсектицидов и инсектицидов на основе РНК демонстрирует значительно меньший экологический риск по сравнению с традиционными пестицидами, что делает их перспективным направлением для устойчивого развития сельского хозяйства.

1.4.4 Увеличение токсической нагрузки на экосистемы

Судьба немодифицированных оцДНК и дцРНК в окружающей среде представляет собой дополнительное преимущество для потенциально подверженных воздействию нецелевых организмов, поскольку оцДНК и дцРНК являются естественными молекулами, которые быстро разрушаются в растениях, воде и почве (Oberemok et al., 2018a, Oberemok et al., 2019a; Parker et al., 2019; Bachman et al., 2020). Удаление примененных оцДНК и дцРНК из агроэкосистемы

после соответствующего периода борьбы с вредителями не только снижает воздействие оцДНК и дцРНК на нецелевые организмы, но и ограничивает продолжительность воздействия на цель, особенно в случае распыления нуклеиновых кислот, тем самым снижая вероятность развития резистентности (Willow et al., 2022).

В настоящее время агроценозы нуждаются в дополнительных мерах стабилизации. Это может быть достигнуто путём разработки и применения новых технологий производства инсектицидных препаратов, которые будут метаболизироваться в соответствии с природными молекулярными механизмами. Такими примерами являются технологии КВАДб и РНКи.

Подводя итоги, можно сказать, что антисмысловые технологии основаны на природных механизмах, контролирующих жизнь клеток. Комплементарные взаимодействия между нуклеиновыми кислотами являются квинтэссенцией клеточного деления, метаболизма и защиты. Создание практических инструментов на основе антисмысловых технологий является актуальным и перспективным направлением научных разработок. Поэтому представляется целесообразным инвестировать десятилетия в исследования в данной области с целью разработки эффективных и экологически безопасных решений. Использование антисмысловых технологий (КВАДб и РНКи) в борьбе с насекомыми-вредителями уже показало свой потенциал. Примечательно, что КВАДб и РНКи показывают наилучшие результаты на определенных группах насекомых-вредителей, увеличивая возможности комбинирования этих подходов для достижения максимального эффекта на больших группах вредителей. В то же время можно говорить об определенной конкуренции между современными антисмысловыми технологиями, однако в ряде случаев физиологические и генетические особенности отдельных групп вредителей не позволят отдельному подходу стать панацеей. На данный момент антисмысловые технологии (КВАДб и РНКи) в борьбе с вредителями насекомых находятся в стадии разработки: накапливаются данные об их успехах и неудачах, крупные компании пытаются создавать конечные продукты, медленно множатся изменения в законодательных

базах отдельных стран по внедрению антисмысловых технологий. Наверное, не стоит ожидать быстрых побед, но очевидно, что победы в данном направлении будут, что позволит улучшить здоровье людей и окружающую среду. Баланс между ценой таких инновационных инсектицидов и эффективностью формул может обеспечить популярность инсектицидов на основе нуклеиновых кислот на рынке в ближайшем будущем.

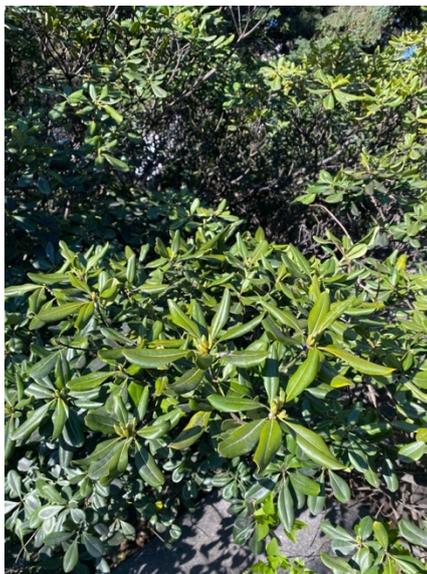
РАЗДЕЛ 2 УСЛОВИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Место выполнения работы и задействованные в экспериментах насекомые

Проводились исследования в период с 2017 по 2024 гг. в лаборатории молекулярной генетики и биотехнологий, которая расположена на кафедре общей биологии и генетики в Институте биохимических технологий, экологии и фармации (ИБТЭФ) «КФУ имени В.И. Вернадского», на опытных участках насаждений лавра благородного *Laurus nobilis* L., падуба остролистного *Ilex aquifolium* L., и смолосемянника обыкновенного *Pittosporum tobira* (Thunb.) W.T. Aiton Никитского ботанического сада.

Объектами исследования являлись популяции насекомых-вредителей: лавровой щитовки *Aonidia lauri* Bouche (Hemiptera: Diaspididae), британской щитовки *Dynaspidiotus britannicus* Newstead (Hemiptera: Diaspididae), мягкой ложнощитовки *Coccus hesperidum* (Hemiptera: Coccidae), японской восковой ложнощитовки *Ceroplastes japonicus* Green (Hemiptera: Coccidae), австралийского желобчатого червеца *Icerya purchasi* Maskell (Hemiptera: Margarodidae) и лавровой листоблошки *Trioza alacris* Flor (Hemiptera: Triozidae). Также исследовались одноцепочечные фрагменты генов, кодирующих 28S рРНК и внутренний транскрибируемый спейсер (ITS2) пре-рРНК.

Насекомые находились в квазиприродных условиях. Мягкая ложнощитовка и австралийский желобчатый червец находились на листьях и стеблях смолосемянника обыкновенного *P. tobira* (Рисунок 5). Японская восковая ложнощитовка находилась на листьях падуба остролистного *I. aquifolium* (Рисунок 6). На листьях и стеблях лавра благородного *L. nobilis* (Рисунок 7) находились лавровая щитовка, британская щитовка и лавровая листоблошка.



А



Б

Рисунок 5 – А – смолосемянник обыкновенный *P. tobira*, Б – небольшие колонии австралийского желобчатого червеца на листьях и стеблях смолосемянника обыкновенного. Крым, НБС, 2023. Оригинальное фото



А



Б

Рисунок 6 – А – падуб остролистный *I. aquifolium*, Б – небольшие колонии японской восковой ложнощитовки на листьях падуба остролистного. Крым, НБС, 2023. Оригинальное фото



А



Б

Рисунок 7 – А – лавр благородный *L. nobilis*, Б – небольшие колонии лавровой и британской щитовок на листьях и стеблях лавра благородного. Крым, НБС, 2023. Оригинальное фото

2.2 Дизайн и синтез олигонуклеотидов

Для создания уникальных видоспецифичных олигонуклеотидных инсектицидов и праймеров диссертантом были самостоятельно разработаны нуклеотидные последовательности. В качестве основы использовались геномные последовательности насекомых, доступные в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Некоторые разработанные олигонуклеотидные инсектициды впоследствии были запатентованы (Патент на изобретение..., 2021).

Против мягкой ложнощитовки был разработан целевой антисмысловый олигонуклеотид КОККУС-11 (5'-ССА-ТСТ-ТТС-GG-3') для воздействия на 28S рРНК (Патент на изобретение..., 2021). Идентификатор последовательности: MF594310.1; диапазон от 655 до 645.

Против японской восковой ложнощитовки был разработан целевой антисмысловый олигонуклеотид ЯВОЛ-11 (5'-CGA-CCG-ACG-AA-3') для воздействия на 28S рРНК (Патент на изобретение..., 2021). Идентификатор последовательности: MT316990.1; диапазон от 95 до 85.

Против австралийского желобчатого червеца был разработан целевой антисмысловой олигонуклеотид АВЖЕЧ-11 (5'-АСА-ССГ-АСГ-АС-3') для воздействия на 28S рРНК (Патент на изобретение..., 2021). Идентификатор последовательности: АУ427432.1; диапазон от 330 до 320.

Против лавровой щитовки был разработан целевой антисмысловой олигонуклеотид ЛАУРИ-11 (5'-АТГ-ССА-АСГ-АТ-3') для воздействия на 28S рРНК. Идентификатор последовательности: КУ219724.1; диапазон от 454 до 444.

Против британской щитовки был разработан целевой антисмысловой олигонуклеотид БРИТ-11 (5'-АТА-ССГ-АСГ-АТ-3') для воздействия на 28S рРНК (Патент на изобретение..., 2021). Идентификатор последовательности: КУ219375.1; диапазон от 445 до 435. Также были разработаны на основе последовательности БРИТ-11 три контрольных олигонуклеотида с отдельными нуклеотидными заменами, трансверсии на 5'-конце – БРИТ(5')-11 (А на Т, 5'-ГТА-ССГ-АСГ-АТ-3'), на 3'-конце – БРИТ(3')-11 (Т на А, 5'-АТА-ССГ-АСГ-АА-3') и в середине последовательности – БРИТ(6)-11 (6-е азотистое основание последовательности; G на C, 5'-АТА-ССС-АСГ-АТ-3') соответственно.

Против лавровой листоблошки были разработаны два целевых антисмысловых олигонуклеотида, ЛАУРА-11 (5'-GAC-ACG-CGC-GC-3') и Alacris-11 (5'-ССА-ССГ-GGT-AG-3') для воздействия на межгенный транскрибируемый спейсер (ITS2) между 5,8S и 28S рРНК (ЛАУРА-11) и областью 28S рРНК в пре-рРНК и зрелой 28S рРНК (АЛАКРИС-11) соответственно. Идентификатор последовательности: МТ038972.1; диапазон от 127 до 117, ЛАУРА-11; диапазон от 546 до 536, АЛАКРИС-11).

В качестве случайных контрольных последовательностей были разработаны три олигонуклеотида: СТГА-11 (5'-СТГ-АСТ-GAC-TG-3'), АСГТ-11 (5'-АСГ-ТАС-GТА-СГ-3') и олигоС (5'-ССС-ССС-ССС-СС-3').

Синтез олигонуклеотидных инсектицидов и контрольных олигонуклеотидов осуществлялся на синтезаторе ДНК/РНК ASM800ЕТ (БИОССЕТ, Новосибирск, Россия). Для этого применялся стандартный фосфорамидитный твердофазный метод на универсальном твердом носителе UnyLinker 500 Å (ChemGenes,

Уилмингтон, США). Работа проводилась в соответствии с рекомендациями производителя на базе кафедры общей биологии и генетики в лаборатории ДНК-технологий, ПЦР-анализа и разработки ДНК-инсектицидов ИБТЭФ «КФУ имени В.И. Вернадского». После этого раствор с готовыми олигонуклеотидными последовательностями ДНК фильтровали и упаривали на вакуумном роторном испарителе (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Швабах, Германия). Данный синтезатор предназначен для одновременного синтеза нескольких олигонуклеотидов и позволяет создавать стандартные и вырожденные ДНК- и РНК-олигонуклеотиды, ДНК-РНК комплексы, фосфоротиоатные ДНК и олигонуклеотиды с различными модификациями и метками.

2.3 Метод масс-спектрометрии

Масса и качество синтезированных фрагментов ДНК определялись с использованием прибора VastoSCREEN на базе масс-спектрометра MALDI-ToF (Литех, Москва, Россия). Соотношение массы к заряду (m/z) олигонуклеотидов измерялось в виде положительных ионов с матрицей 3-гидроксипиколиновой кислотой на приборе LaserToF LT2 Plus (Scientific Analysis Instruments, Стретфорд, Великобритания) в соотношении 2:1. Теоретическое отношение m/z рассчитывалось автоматически с помощью программы ChemDraw 18.0 (CambridgeSoft, Кембридж, штат Массачусетс, США) и отличалось не более чем на 0,2% от полученного отношения m/z (Таблица 2).

Таблица 2 – Результаты анализа синтезированных олигонуклеотидов методом MALDI-TOF

Олигонуклеотид	Теоретическое соотношение m/z	Практическое соотношение m/z
Олигонуклеотидные инсектициды		
ЛАУРИ-11	3329,77	3324,61
БРИТ-11	3326,01	3327,51
ЯВОЛ-11	3334,62	3343,60

АВЖЕЧ-11	3294,61	3295,72
ЛАУРА-11	3326,60	3328,73
АЛАКРИС-11	3341,60	3337,28
КОККУС-11	3283,11	3293,78
Контрольные ДНК-олигонуклеотиды		
БРИТ(5')-11	3311,86	3315,60
БРИТ(6)-11	3279,28	3284,61
БРИТ(3')-11	3337,36	3333,63
АСГТ-11	3340,61	3336,71
олигоС-11	3118,56	3123,02
СТГА-11	3331,60	3332,48
Праймеры для ПЦР		
Диасп28S-F, ген 28S рРНК, прямой праймер	5473,01	5466,96
Диасп28S-R, ген 28S рРНК, обратный праймер	5450,09	5442,95
Явол28S-F, ген 28S рРНК, прямой праймер	5162,92	5172,40
Явол28S-F, ген 28S рРНК, обратный праймер	5475,97	5485,60
Авжеч28S-F, ген 28S рРНК, прямой праймер	6181,08	6189,09
Авжеч28S-F, ген 28S рРНК, обратный праймер	6134,09	6142,76
Алакрис-F, ген 28S рРНК, прямой праймер	4896,25	4898,64
Алакрис-R, ген 28S рРНК, прямой праймер	6089,07	6081,59
Коккус-F, ген 28S рРНК,	4892,34	4898,04

прямой праймер		
Коккус-R, ген 28S рРНК, обратный праймер	4866,71	4853,29
Брит-F, ген 28S рРНК, прямой праймер	5469,08	5444,65
Брит-R, ген 28S рРНК, обратный праймер	5445,11	5436,01

2.4 Применение ДНК-олигонуклеотидов на насекомых

Олигонуклеотидные инсектициды (ЛАУРИ-11, БРИТ-11, КОККУС-11, ЯВОЛ-11, АВЖЕЧ-11, АЛАКРИС-11 и ЛАУРА-11) были растворены в воде, свободной от нуклеаз, РНКаз и ДНКаз, до концентрации 100 нг/мкл действующего вещества (Приложение А; Приложение Б; Приложение В; Приложение Г). Во время обработки все насекомые находились на растениях-хозяевах и были опрысканы с использованием ручного распылителя. Для эффективной обработки насекомых ручным опрыскивателем использовали мелкокапельный распыл, а также учитывали угол распыления (Oberemok et al., 2025b). Распылитель направляли так, чтобы капли раствора попадали на листья и стебли с обеих сторон. На каждый квадратный метр листьев использовалось 10 миллилитров раствора олигонуклеотидного инсектицида (мг на м²) (Oberemok et al., 2025b). Для контроля применялись следующие группы: обработанные водой, случайным антисмысловым олигонуклеотидом и эталонным коммерческим химическим инсектицидом. Во всех группах исследований были использованы личинки. Личинки первого и второго возрастов обрабатывались в независимых экспериментах, а их показатели выживаемости рассчитывались статистически. Смертность насекомых регистрировали и рассчитывали в зависимости от ситуации. Подсчет насекомых производился с помощью микроскопа Nikon SMZ745 (Nikon Corporation, Токио, Япония) и камеры Tourcam ucsmos 5100 кра для фотографирования насекомых. Расчёты проводились на 2-е, 3-и, 4-е, 6-е, 7-е,

8-е, 9-е, 10-е, 12-е и 14-е сутки путём деления количества погибших особей на общее количество особей на листе и умножения на 100%.

2.5 Обработка химическими инсектицидами

Для сравнения эффективности олигонуклеотидных инсектицидов с эффективностью коммерчески доступных химических инсектицидов в качестве стандарта использовали инсектициды. Среди них тиаметоксам ((E)-3-(2-хлор-1,3-тиазол-5-илметил)-5-метил-1,3,5-окса-диазинан-4-илиден(нитро)амин (Международный союз теоретической и прикладной химии [ИЮПАК]); IRAC MoA 4A неоникотиноидная группа; Актара[®] 25 WG; 0,8 г/л; Syngenta[®], Вена, Австрия); фосфорорганический инсектицид фенитротиион [О,О-Диметил-О-(3-метил-4-нитрофенил)тиофосфат] (Международный союз теоретической и прикладной химии [ИЮПАК]); IRAC MoA 1B фосфоорганические соединения; Сумитион[®]; 2 г/л; Nufarm, Тувумба, Австралия). Использовался ручной опрыскиватель, объем раствора составлял 10 мл на м² листьев растений.

2.6 Измерение массы насекомых

Взвешивание личинок насекомых и растений проводили на аналитических весах OHAUS Explorer (OHAUS Corporation, Парсиппани, штат Нью-Джерси, США) с точностью до 0,1 мг и 0,1 г. Перед началом взвешивания особи насекомых и листья растений были случайным образом распределены и взвешены так, чтобы стартовая биомасса отличалась не более чем на 3%.

2.7 Гомогенизация тканей насекомых и экстракция РНК

Подлежащие к выделению РНК образцы насекомых находились морозильном отсеке при соответствующем температурном режиме от -18 до -25°C. Материалы из некоторых экспериментов хранились под слоем раствора "IntactRNA" (Евроген, Москва, Россия) для предотвращения излишней деградации РНК. Образцы тканей насекомых (30–40 мг) были гомогенизированы в лизирующем буфере (0,5 мл) перед экстракцией с помощью коммерческих наборов. Использовался прибор MagNA Lyser с системой гомогенизации MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics GmbH, Мангейм, Германия) (5500 об./мин, 10 с). После гомогенизации выделение РНК проводили в соответствии с рекомендуемыми инструкциями производителя, при помощи набора "ExtractRNA" (Евроген, Москва, Россия) (ExtractRNA, 2025).

2.8 Обратная транскрипция

РНК использовали для синтеза кДНК с использованием набора MMLV Reverse Transcriptase (Евроген, Москва, Россия) и геноспецифического обратного праймера в соответствии с рекомендациями производителя. Обратный синтез РНК (в среднем 1 мкг для всех исследований) проводился в реакционном объеме 20 мкл при 40°C в течение 60 мин (или 30 мин, если объем 10 мкл) и при 70°C в течение 15 мин для остановки реакции с использованием системы LightCycler® 96 (Roche, Базель, Швейцария). Пробирки Эппендорф (0,1 мкл), содержащие синтезированные кДНК, хранили при соответствующем температурном режиме от 18 до -20°C.

2.9 ПЦР в реальном времени (анализ экспрессии генов)

Количественную ПЦР в реальном времени проводили с флуоресцентным красителем SYBR Green I. Реакционную смесь 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген,

Москва, Россия) в соответствии с инструкциями производителя (5X qPCRMix-HS SYBR, 2025). В системе SYBR Green I кДНК (2 мкл) добавляли к смеси 5X qPCRMix-HS SYBR. Амплификация была проведена на приборе LightCycler® 96 (Roche, Базель, Швейцария). ПЦР проводили в трёх повторностях.

Для анализа концентрации рРНК насекомых-вредителей использовали следующие пары праймеров, последовательности которых представлены ниже.

Геноспецифичные праймеры, Коккус-F (5'-ACC-GTC-GAC-GAACTG-G-3') и Коккус-R (5'-ACG-TCA-GAA-TCG-CTG-C-3'), прямой и обратный, соответственно, использовали для количественного определения концентрации 28S рРНК *C. hesperidum*. Для амплификации использовали разработанный специфический протокол: 10 мин начальной денатурации при 95°C, затем 30 циклов с 10 с денатурацией при 95°C, 15 с отжига праймеров при 62°C и 14 с удлинением при 72°C.

Геноспецифичные праймеры, Диасп28S-F (5'-CGA-AAC-CCG-TAC-ATG-TCG-3') и Диасп28S-R (5'-CGA-CGG-GCC-GTT-GAG-AC-3'), прямой и обратный, соответственно, использовали для количественного определения относительной концентрации 28S рРНК (средняя концентрация) в смешанных популяциях насекомых-вредителей *D. britannicus* и *A. lauri*. Был применен разработанный специфический протокол: 10 мин начальной денатурации при 95°C, затем 35 циклов с 10 с денатурации при 95°C, 20 с отжига праймеров при 58°C и 20 с удлинения при 72°C. ПЦР была проведена в трёх повторах. На последнем этапе для оценки специфичности амплификации и наличия дополнительных продуктов все продукты ПЦР расплавляли.

Геноспецифичные праймеры, Брит-F (5'-GCG-AAA-CCC-GTA-CAT-GTC-3') и Брит-R (5'-ACG-ACT-GTC-CGC-ATC-AGC-3'), прямой и обратный, соответственно, использовали для количественного определения концентрации 28S рРНК *D. britannicus*. Был применен разработанный специфический протокол: 10 мин начальной денатурации при 95°C, затем 35 с 10 с денатурации при 95°C, 20 с отжига праймеров при 56°C, 15 секунд элонгации цепи при 72°C.

Геноспецифичные праймеры, Явол28S-F (5'-ACA-GAG-CCC-GTG-AAT-CC-3') и Явол28S-R (5'-CGA-ACT-GAA-AAC-GCG-TCC-3'), прямой и обратный, соответственно, использовали для количественного определения концентрации 28S рРНК *C. japonicus*. Был применен разработанный специфический протокол: 10 мин начальной денатурации при 95°C, затем 35 с 10 с денатурации при 95°C, 20 с отжига праймеров при 56°C, 15 секунд элонгации цепи при 72°C.

Геноспецифичные праймеры, Авжеч28S-F (5'-AGG-ATT-CAC-ACG-GTG-GAG-TC-3') и Авжеч28S-R (5'-GCA-AGT-GCA-CAA-CTT-GAA-CG-3'), прямой и обратный, соответственно, использовали для количественного определения концентрации 28S рРНК *I. purchasi*. Был применен разработанный специфический протокол: 10 мин начальной денатурации при 95°C, затем 35 циклов с 10 с денатурации при 95°C, 20 с отжига праймеров при 55°C, 15 секунд элонгации цепи при 72°C.

Геноспецифичные праймеры, Алакрис-F (5'-GAC-CTC-GGG-CTG-TAC-G-3') и Алакрис-R (5'-CGC-TTA-TTA-ATA-TGC-TTA-AA-3'), прямой и обратный, соответственно, использовали для количественного определения концентрации 28S рРНК *T. alacris*. Был применен разработанный специфический протокол: 10 мин начальной денатурации при 95°C, затем 35 циклов с 10 с денатурации при 95°C, 20 с отжига праймеров при 52°C, 15 секунд элонгации цепи при 72°C.

ПЦР была проведена в трёх повторах для всех исследований. На последнем этапе для оценки специфичности амплификации и наличия дополнительных продуктов все продукты ПЦР расплавляли. Анализ изменения экспрессии генов с использованием красителя SYBR Green I проводили по методике Бустин, Мюллер (Bustin and Muller, 2005).

2.10 Секвенирование ДНК

ПЦР-продукты (ампликоны), полученные из личинок мягкой ложнощитовки, лавровой щитовки, британской щитовки и австралийского желобчатого червеца очищали с использованием отечественного коммерческого

набора Cleanup S-Cap (Евроген, Москва, Россия). Набор BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems, Вильнюс, Литва) использовали для проведения полимеразной цепной реакции для дальнейшего секвенирования. Полимеразные реакции проводили с 2 мкл очищенной ДНК и 2 мкл праймеров (12,8 нг/мкл). Первоначально ДНК денатурировали в течение 1 мин при 96°C, затем следовали 30 циклов по 10 с денатурации при 96°C, 5 с гибридизации при 50°C и 4 мин элонгации при 60°C. Ампликоны секвенировали в обоих направлениях на капиллярном ДНК-секвенаторе НАНОФОР-05 (Синтол, Москва, Россия) на базе кафедры общей биологии и генетики в лаборатории Секвенирования ДНК ИБТЭФ «КФУ имени В.И. Вернадского». ДНК была проанализирована при помощи программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Zhang et al., 2000) и ClustalW 2.0.3 (Thompson et al., 1994). Также услуги секвенирования ампликонов были оказаны компанией ЗАО Евроген (Евроген, Москва, Россия).

Секвенирование фрагмента гена 28S рРНК мягкой ложнощитовки проводили с помощью пары праймеров Коккус-F (5'-ACC-GTC-GAC-GAA-CTG-G-3') и Коккус-R (5'-ACG-TCA-GAA-TCG-CTG-C-3'), образующей ампликон длиной 121 п.н.

Секвенирование фрагмента гена 28S рРНК японской восковой ложнощитовки проводили с помощью пары праймеров Явол28S-F (5'-ACA-GAG-CCC-GTG-AAT-CC-3') и Явол28S-R (5'-CGA-ACT-GAA-AAC-GCG-TCC-3'), образующей ампликон длиной 169 п.н.

Секвенирование фрагмента гена 28S рРНК австралийского желобчатого червеца проводили с помощью пары праймеров Авжеч28S-F (5'-AGG-ATT-CAC-ACG-GTG-GAG-TC-3') и Авжеч28S-R (5'-GCA-AGT-GCA-CAA-CTT-GAA-CG-3'), образующей ампликон длиной 212 п.н.

Секвенирование фрагмента гена 28S рРНК лавровой щитовки проводили с помощью пары праймеров Диасп28S-F (5'-CGA-AAC-CCG-TAC-ATG-TCG-3') и Диасп28S-R (5'-CGA-CGG-GCC-GTT-GAG-AC-3'), образующей ампликон длиной 127 п.н.

Секвенирование фрагмента гена 28S рРНК британской щитовки проводили с помощью пары праймеров Брит-F (5'-GCG-AAA-CCC-GTA-CAT-GTC-3') и Брит-R (5'-ACG-ACT-GTC-CGC-ATC-AGC-3'), образующей ампликон длиной 145 п.н.

2.11 Детекция продуктов амплификации и спектрофотометрия

Горизонтальный электрофорез в агарозном геле проводится согласно определённому алгоритму. Сначала в камеру для электрофореза помещается приготовленный 1,8%-ный агарозный гель. Затем ТВЕ-буфер заливается в ванночку для электрофореза, а из геля удаляются гребенки. В каждую ячейку наносится 12 мкл пробы, содержащей 9 мкл исследуемого образца и 3 мкл красителя синего цвета Gel Loading Dye, Blue (Евроген, Москва, Россия). После этого камера подключается к источнику электрического питания. Время эксперимента может варьироваться от 30 минут до 1 часа. По завершении этого периода гель достаётся и помещается в трансиллюминатор для визуализации нуклеиновых кислот с использованием трансиллюминатора. Электрофоретическое разделение происходит в течение 30 минут в камере для электрофореза. Нуклеиновые кислоты в 1,8%-ном агарозном геле визуализировали при помощи трансиллюминатора. Для количественной оценки светимости выбранных участков на электрофореграмме использовалась программа GelAnalyzer 23.1.1.

Качество и концентрацию полученной суммарной РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific, Уолтем, штат Массачусетс, США). Измерения оптической плотности проводят на максимумах поглощения 260 и 280 нм. На отношение A_{260}/A_{280} (1,8–2 – чистая РНК) имеет смысл обращать внимание, только если измерение проводится в буферном растворе (например, TE) при нейтральном рН. Измерения в воде приводят к отклонениям до 14% и заниженному A_{260}/A_{280} . Соотношение показаний при 260 нм и 280 нм ($R_{260/280}$)

дало оценку чистоты РНК (Okamoto and Okabe, 2000). Образцы РНК были разбавлены в деионизированной воде Milli-Q (Millipore, Мольсайд, Франция).

2.12 Анализ нуклеазной активности

Активность внутриклеточной ДНК-нуклеазы измеряли в гомогенатах тканей целевых и нецелевых организмов. 5 мг целевой ткани измельчали и растворяли в 10 мкл деионизированной воды Milli-Q (Millipore, Мольсайд, Франция), после чего добавляли 10 мкл олинцида в концентрации 100 нг/мкл. Растворы инкубировали в течение 24 ч при 27°C и в течение 2 ч при 90°C для инактивации нуклеаз. Наконец, растворы центрифугировали при 12000 g в течение 1 мин. Полученные супернатанты подвергали электрофорезу в 1,8%-ом агарозном геле со стандартным буфером TBE и бромистым этидием (10–15 мкл в концентрации 10 мг/мл на 55 мл 1,8% агарозного геля) в качестве красителя нуклеиновых кислот.

2.13 Статистический анализ

Эксперименты были проведены в 3-х повторностях на количестве от 30 до 350 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента. Для анализа и обработки данных, полученных в ходе исследований, применялись статистические методы. В зависимости от ситуации использовались параметрический тест Стьюдента и непараметрический критерий хи-квадрат Пирсона (χ^2) с поправкой Йетса. Данные методы позволили оценить значимость различий в смертности и концентрации рРНК между контрольной и экспериментальной группами на 2-е, 3-и, 4-е, 6-е, 7-е, 8-е, 9-е, 10-е, 12-е и 14-е сутки. Статистические расчеты проводили в программах Microsoft Excel и Statistica. В графиках и таблицах представлены средние значения и стандартные ошибки полученных данных. Различия между средними считались статистически

значимыми при $p < 0,05$ и $p < 0,01$. Все исследования в данной работе проводились с тремя повторениями.

РАЗДЕЛ 3 БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ НА ОСНОВЕ АНТИСМЫСЛОВЫХ ФРАГМЕНТОВ, КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ 28S РИБСОМАЛЬНОЙ РНК И ITS2-УЧАСТКАМ ПРЕ-РРНК

Важнейшим результатом данного исследования стало открытие инсектицидной активности РНКазы Н-зависимых антисмысловых 11-мерных фрагментов (ЛАУРИ-11, БРИТ-11, ЯВОЛ-11, АВЖЕЧ-11 и ЛАУРА-11) генов, кодирующих 28S рРНК лавровой щитовки, британской щитовки, японской восковой ложнощитовки, австралийского желобчатого червеца и лавровой листоблошки, а также фрагмента (ЛАУРА-11) гена, кодирующего внутренней транскрибируемый спейсер (ITS2) пре-рРНК лавровой листоблошки. Были изучены показатели смертности насекомых, повышение и снижение концентрации 28S рРНК в клетках насекомых. Кроме этого, был отработан алгоритм создания олигонуклеотидных инсектицидов для контроля смешанных популяций насекомых-вредителей семейства Diaspididae, а также оценена значимость замен отдельных нуклеотидов на 3'-конце, 5'-конце и 6-м положении нуклеотида в олигонуклеотидном инсектициде БРИТ-11 для его эффективности.

3.1 Биологическая эффективность олигонуклеотидного инсектицида КОККУС-11 в отношении личинок мягкой ложнощитовки

В данном исследовании контактный олигонуклеотидный инсектицид КОККУС-11 (5'-ССА-ТСТ-ТТС-GG-3') в концентрации 100 нг/мкл продемонстрировал высокую эффективность против личинок *C. hesperidum* уже на вторые сутки, вызывая значительную смертность ($53,53 \pm 9,99\%$; $p < 0,01$). (Рисунок 8). Аналогичные результаты были получены на 2-е сутки с использованием неоникотиноидного инсектицида тиаметоксама в концентрации 0,8 г/л ($68,94 \pm 22,63\%$; $p < 0,01$) (Рисунок 8, а).

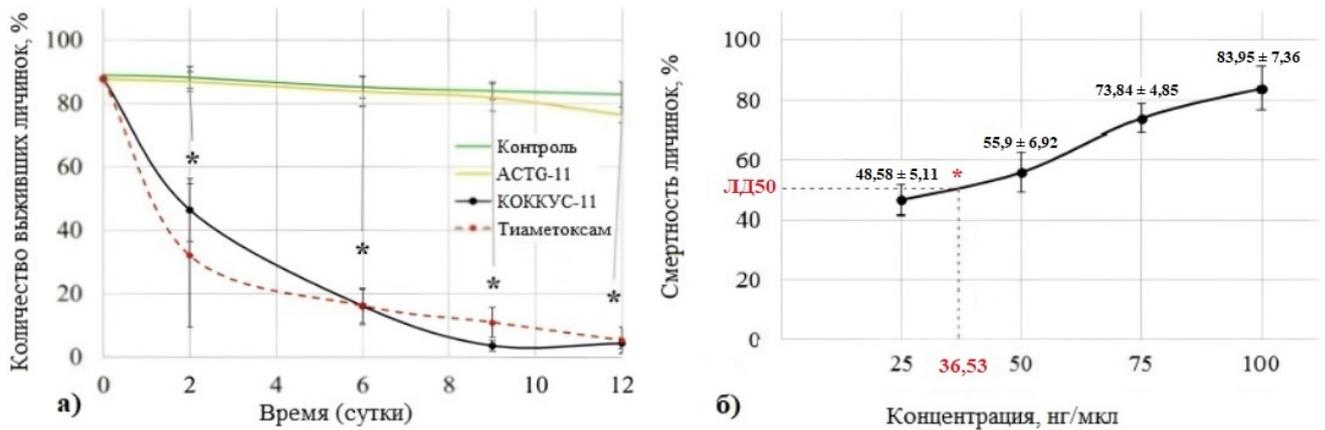


Рисунок 8 – Влияние одноцепочечного олигонуклеотидного инсектицида КОККУС-11 на личинки *C. hesperidum*. Личинки были обработаны контактно олигонуклеотидным инсектицидом (КОККУС-11), коммерческим неоникотиноидным инсектицидом Тиаметоксамом, контрольным ДНК-олигонуклеотидом АСТГ-11 (АСТГ-11) и водой (Контроль): а) динамика смертности вредителя; б) кривая зависимости доза-эффект для КОККУС-11 (6-е сутки эксперимента); ЛД₅₀ обозначена красной звездочкой. Средние значения и стандартные ошибки средних значений представлены на панелях (а, б); * отмечено при $p < 0,01$. Эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 30-35 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

Смертность прогрессивно увеличивалась в группе КОККУС-11 до 9 суток. К концу эксперимента на 12-е сутки смертность от КОККУС-11 достигла $95,59 \pm 1,63\%$ ($p < 0,01$). Аналогичные данные были получены для тиаметоксама. К концу эксперимента в группе с тиаметоксамом смертность составила $94,7 \pm 4,11\%$ ($p < 0,01$), что подтверждает то, что инсектицид КОККУС-11 по эффективности сопоставим с тиаметоксамом (Гальчинский, 2025а).

Контрольный олигонуклеотид АСТГ-11 не показал существенного инсектицидного эффекта по сравнению с контрольной группой (обработанной водой). Уровень смертности в группе АСТГ-11 составил $23,53 \pm 2,51\%$ ($p = 0,14$) на 12-е сутки (Рисунок 8, а). В контрольной группе, обработанной водой, смертность сохранялась на уровне 10–15% на протяжении всего эксперимента. Также была построена кривая зависимости эффекта от дозы, и установлено, что ЛД₅₀ для личинок *C. hesperidum* составила 36,53 нг/мкл (Рисунок 8, б). Для оценки возможного негативного воздействия ДНК-олигонуклеотида на растения был

измерен рН листьев, который составил $6,02 \pm 0,05$ в группе КОККУС-11 и $6,08 \pm 0,01$ в группе контроля ($p > 0,05$). Значимых различий не обнаружено, что подтверждает экологическую безопасность олигонуклеотидного инсектицида КОККУС-11 (Гальчинский, 2025а).

На основе полученных данных о инсектицидной активности была проведена оценка специфичности действия олионцида КОККУС-11 путем анализа его взаимодействия с целевой молекулой – 28S рРНК. Было проведено секвенирование фрагмента гена 28S рРНК, чтобы определить нуклеотидную последовательность ампликона и подтвердить его соответствие целевой области гена 28S рРНК. Секвенирование фрагмента гена 28S рРНК *C. hesperidum* было выполнено с помощью пары праймеров: Коккус-Ф (5'-ACC-GTC-GAC-GAA-CTG-G-3'), и Коккус-Р (5'-ACG-TCA-GAA-TCG-CTG-C-3'). Эти праймеры образуют ампликон длиной 121 п.н. После удаления артефактов секвенирования была получена последовательность из 86 нуклеотидов, которая полностью совпадает (100%) с фрагментом гена 28S рРНК *C. hesperidum* в базе данных GenBank (номер записи MF594310.1). Это подтверждает, что в экспериментах на личинках *C. hesperidum* использовался сайт-специфический олионцид, так как он совпал в области целевого сайта (диапазон: от 655 до 645). Последовательность из 86 нуклеотидов была загружена в систему GenBank под номером OR889423.1 (Приложение Д).

Стоит отметить, что снижение экспрессии целевого гена является золотым стандартом для доказательства специфичности действия (Dias and Stein, 2002) для антисмысловых олигонуклеотидов. Однако в данном исследовании было обнаружено увеличение экспрессии целевой 28S рРНК (Рисунок 9). Экспрессия увеличивалась синусоидально (в течение 1-го часа) в ответ на применение олигонуклеотидного инсектицида КОККУС-11, а затем постепенно плавно снижалась.

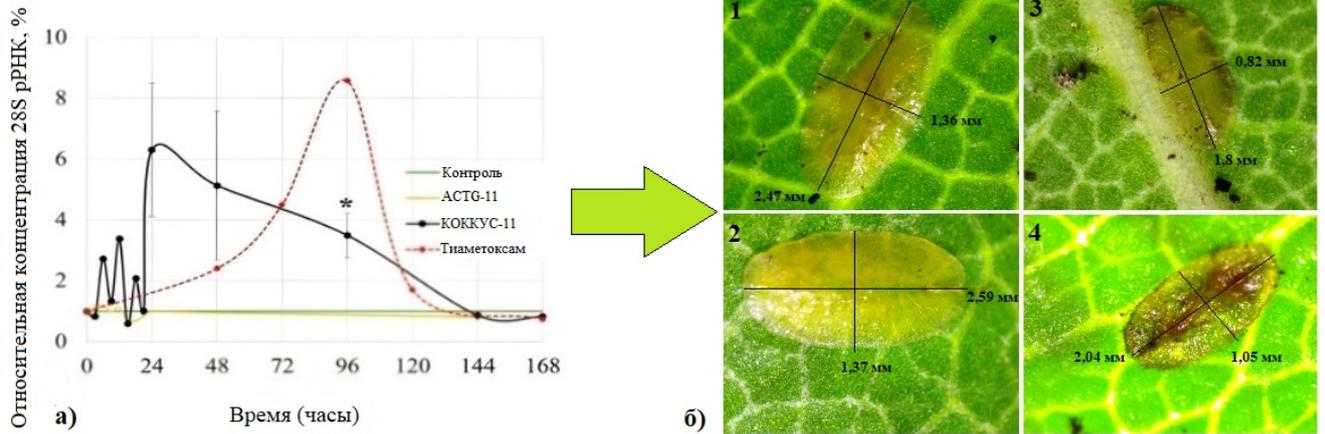


Рисунок 9 – а) Относительная концентрация 28S рРНК мягкой ложнощитовки после обработки олигонуклеотидами. На графике представлены средние значения и стандартные ошибки средних для 3-х повторностей по сравнению с контрольной группой, обработанной водой. Достоверность различий между группой "КОККУС-11" и контрольной группой обозначена * при $p < 0,01$ на 4-е сутки эксперимента; б) Морфология насекомых (на 2-е сутки) исследовалась с помощью световой микроскопии: 1 – контрольная личинка с неповрежденными покровами; 2 – личинка из группы АСТГ-11 с неповрежденными покровами; 3 – личинка из группы КОККУС-11 с некрозом тканей по краям тела личинки; 4 – личинка из группы с тиаметоксам с заметным потемнением тела

Максимальное увеличение экспрессии 28S рРНК было обнаружено через 24 часа и было более чем в 6 раз выше, чем в контрольной группе ($6,31 \pm 2,44$; Рисунок 9, а) (Гальчинский, 2025а).

Значительная разница по сравнению с контрольной группой наблюдалась на 4-е сутки ($3,49 \pm 0,72$, $p < 0,01$), что соответствует периоду массовой гибели обработанных насекомых. Возможным объяснением этой реакции клеток является сверхкомпенсация подавления гена, поскольку 28S рРНК и другие рРНК жизненно важны для биосинтеза белка (Terenius et al., 2011). Олигонуклеотидный инсектицид КОККУС-11 изменил биогенез рибосом, который тесно связан с контролем клеточного роста и пролиферации. При осмотре внешнего вида насекомых было обнаружено почернение краев тела в результате гибели клеток в группе с КОККУС-11 (Рисунок 9, б-3) и почернение всего насекомого в группе с тиаметоксамом (Рисунок 9, б-4), тогда как в контрольной группе и группе контрольного олигонуклеотида АСТГ-11 не было никаких видимых изменений (Рисунок 9, б-1, б-2). Также обнаружено, что на макроуровне у группы,

обработанной КОККУС-11, было легче отделить кутикулу от тела насекомого, что является следствием нарушения архитектуры кутикулы. В группе, обработанной тиаметоксам, также было обнаружено значительное увеличение экспрессии 28S рРНК на 4-е сутки ($8,57 \pm 0,36$, $p < 0,01$) (Гальчинский, 2025а).

Более того, как показывает пример олигонуклеотидного инсектицида в данном исследовании, можно разрабатывать олигонуклеотидные инсектициды для широкого спектра насекомых, принимая данную стратегию, проиллюстрированную на Рисунке 10. В этом отношении олигонуклеотидные инсектициды имеют большое преимущество: в дополнение к их избирательному воздействию на целевое насекомое такие препараты теперь можно производить быстро и в больших количествах. Даже если выработалась генетическая устойчивость, препараты можно быстро модифицировать с помощью другой последовательности, чтобы вернуть олигонуклеотидным инсектицидам их надлежащую эффективность (Гальчинский, 2025а).

С точки зрения молекулярной биологии, подобная гибкость обусловлена специфичностью олигонуклеотидов, которые могут комплементарно связываться с определёнными участками РНК насекомых-вредителей, блокируя ключевые процессы жизнедеятельности – например, синтез белков за счёт ингибирования рибосомальных РНК. Это позволяет не только точно воздействовать на вредных насекомых, минимизируя вред для полезных организмов и окружающей среды, но оперативно адаптировать химический состав инсектицидов к возникающей резистентности.

Таким образом, стратегия разработки олигонуклеотидных инсектицидов сочетает в себе три ключевых преимущества: избирательность действия, масштабируемость производства и адаптивность к механизмам устойчивости насекомых (Рисунок 10). Это создаёт прочную основу для создания эффективных и экологически безопасных средств защиты растений в будущем.



Рисунок 10 – Общая схема разработки и применения избирательно действующих олигонуклеотидных инсектицидов с высокой степенью экологичности на основе КВАД-биотехнологии (контактно вводимой антисмысловой ДНК):

- 1, 2 – растение *P. tobira*, пораженное мягкой ложнощитовкой *C. hesperidum*;
- 3, 4 – генетический анализ популяции насекомых-вредителей на наличие мутаций и разработка дизайна олигонуклеотидного инсектицида;
- 5 – синтез олигонуклеотидных инсектицидов на автоматическом ДНК-синтезаторе;
- 6, 7 – обработка насекомых-вредителей разработанным олигонуклеотидным инсектицидом

3.2 Биологическая эффективность олигонуклеотидного инсектицида ЯВОЛ-11 в отношении личинок японской восковой ложнощитовки

Инсектицидный потенциал 11-мерного олигонуклеотидного инсектицида ЯВОЛ-11 оценивали на основе его влияния на жизнеспособность личинок первого и второго возраста личинок *C. japonicus*. Сконструированный олигонуклеотидный инсектицид ЯВОЛ-11 (5'-CGA-CCG-ACG-AA-3') продемонстрировал высокую биологическую эффективность, вызывая экспоненциальный рост смертности

личинок при обработке в концентрации 0,1 г/л воды, достигая максимального эффекта к 10-м суткам (Рисунок 11).

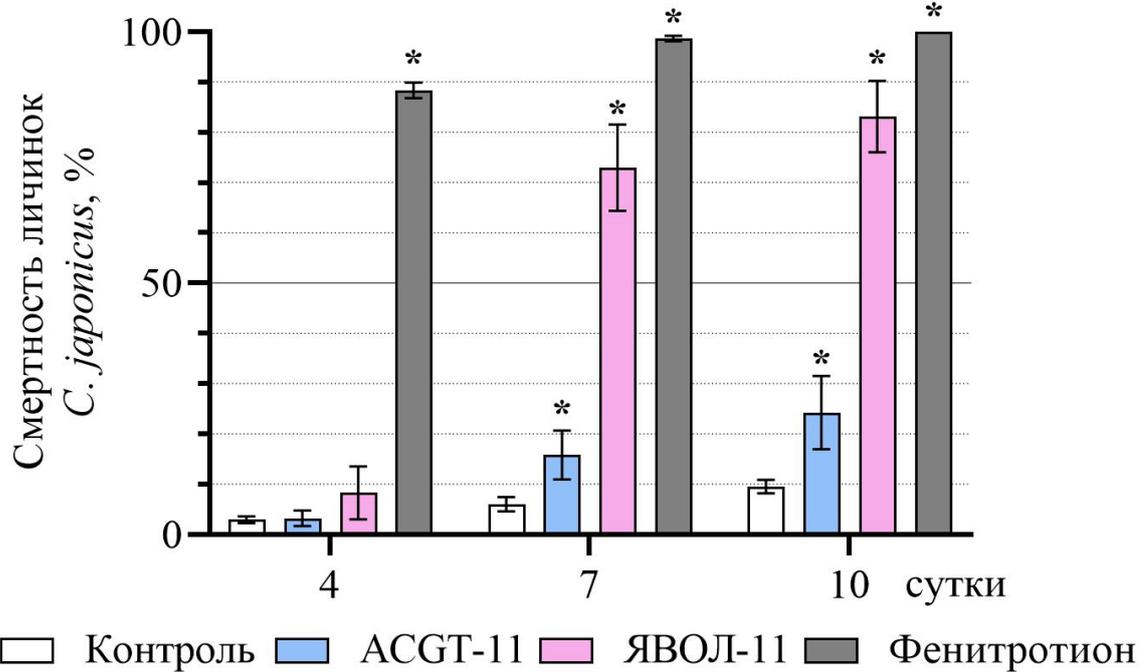


Рисунок 11 – Динамика смертности личинок японской восковой ложнощитовки после их контактной обработки водой, ЯВОЛ-11-фрагментом, АСГТ-11-фрагментом (контрольный фрагмент; 5'-АСГ-ТАС-ГТА-СГ-3') и фосфорорганическим инсектицидом фенитроотионом, в концентрации 2 г/л воды. Достоверность смертности насекомых в группах "АСГТ", "ЯВОЛ-11" и "Фенитроотион" против контроля обозначена * при $p < 0,01$. Эксперимент был проведён в 3-х повторностях по 80-90 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента

На седьмые и десятые сутки после обработки личинок ДНК-олигонуклеотидами достоверное увеличение смертности насекомых по сравнению с контролем было обнаружено в группах "АСГТ-11" ($\chi^2 = 9,099$, $p < 0,05$, $N = 431$, $df = 1$; $\chi^2 = 27,548$, $p < 0,01$, $N = 591$, $df = 1$), "ЯВОЛ-11" ($\chi^2 = 217,023$, $p < 0,01$, $N = 697$, $df = 1$; $\chi^2 = 362,481$, $p < 0,01$, $N = 736$, $df = 1$) и "Фенитроотион" ($\chi^2 = 435,974$, $p < 0,01$, $N = 504$, $df = 1$; $\chi^2 = 203,550$, $p < 0,01$, $N = 266$, $df = 1$). В среднем погибло на седьмые сутки $6,06 \pm 1,40\%$, $15,83 \pm 4,85\%$, $72,95 \pm 8,56\%$ и $98,66 \pm 0,57\%$ личинок из групп контроля, "АСГТ-11", "ЯВОЛ-11" и "Фенитроотион" соответственно (Плугатарь, Гальчинский и др., 2025а). На

десятые сутки эксперимента число погибших насекомых повысилось и достигло $10,28 \pm 2,25\%$, $24,24 \pm 7,28\%$, $83,11 \pm 7,06\%$ и 100% в контрольной группе, "АСГТ-11", "ЯВОЛ-11" и "Фенитроцион", соответственно (Рисунок 11). Таким образом, олигонуклеотидный инсектицид "ЯВОЛ-11" показал существенную эффективность по сравнению с фосфорорганическим инсектицидом фенитроционом. Учитывая природное происхождение олигонуклеотидных инсектицидов, данный подход может составить значительную конкуренцию фосфорорганическим инсектицидам и другим неселективным химическим инсектицидам (Плугатарь, Гальчинский и др., 2025а).

3.3 Влияние олигонуклеотидного инсектицида ЯВОЛ-11 на концентрацию 28S рРНК в клетках личинок японской восковой ложнощитовки

На основе полученных данных о инсектицидной активности, как и для олинцида КОККУС-11, была проведена оценка специфичности действия олинцида ЯВОЛ-11 путем анализа его взаимодействия с целевой молекулой – 28S рРНК *C. japonicus*. Было проведено секвенирование фрагмента гена 28S рРНК, чтобы определить нуклеотидную последовательность ампликона и подтвердить его соответствие с целевой областью гена 28S рРНК. Секвенирование фрагмента гена 28S рРНК *C. japonicus* было выполнено с помощью пары праймеров: Явол28S-F (5'-ACA-GAG-CCC-GTG-AAT-CC-3') и Явол28S-R (5'-CGA-ACT-GAA-AAC-GCG-TCC-3'). Эти праймеры образуют ампликон длиной 169 п.н. После удаления артефактов секвенирования была получена последовательность из 127 нуклеотидов, которая полностью совпадает (100%) с фрагментом гена 28S рРНК *C. japonicus* в базе данных GenBank (номер записи MT316990.1). Это подтверждает, что в экспериментах на личинках *C. japonicus* использовался сайт-специфический олинцид, так как он совпал в области целевого сайта (диапазон: от 95 до 85). Последовательность из 127 нуклеотидов была загружена в систему GenBank под номером OR852411.1 (Приложение Е).

Было установлено, что исследуемая концентрация 28S рРНК у насекомых, контактно обработанных ЯВОЛ-11-фрагментом, была значительно ниже (в 3,1 раза), чем у контрольных, обработанных водой ($p < 0,01$, Рисунок 12).

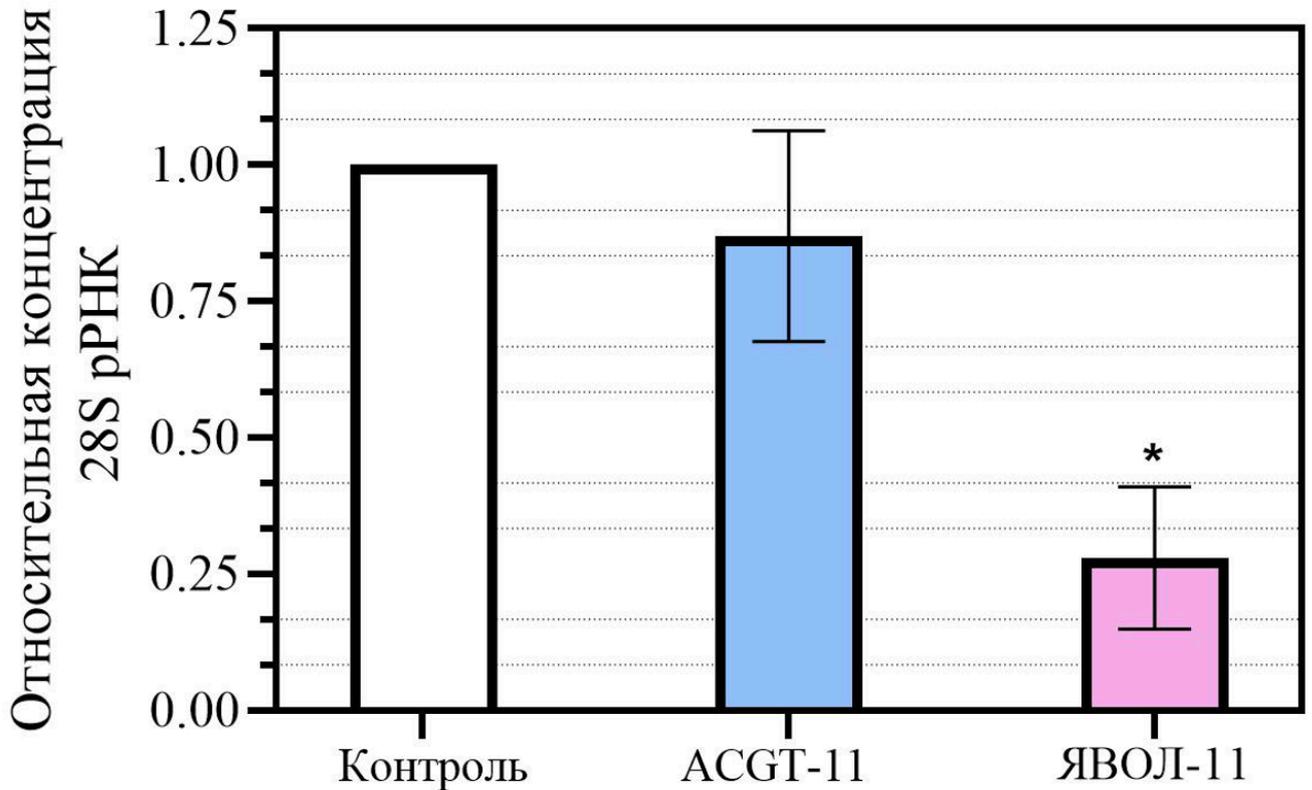


Рисунок 12 – Относительная концентрация 28S рРНК в личинках японской восковой ложнощитовки на четвертые сутки после обработки олигонуклеотидами. На графике представлены средние значения и стандартные ошибки средних для трёх повторностей по сравнению с контрольной группой, обработанной водой. Достоверность различий между группой "ЯВОЛ-11" и контрольной группой, обозначена * при $p < 0,01$

Это можно объяснить множеством партнеров по связыванию рРНК, ограничивающих её доступность для антисмысловых олигонуклеотидов, и более успешным привлечением ДНК-направляемой РНКазы Н, такой как РНКазы Н1 (Gal'chinsky et al., 2024a; Oberemok et al., 2025c). Таким образом, были приведены доказательства того, что целевая 28S рРНК деградирует и что ЯВОЛ-11-фрагмент снижает ее концентрацию в качестве антисмыслового олигонуклеотида, зависящего от РНКазы Н (Плугатарь, Гальчинский и др., 2025а). Было также обнаружено заметное снижение (в 1,3 раза; $p > 0,05$) концентрации 28S рРНК у

насекомых, в группе, контактно обработанных АСГТ-11-фрагментом. Оценивая несколько повышенный уровень смертности личинок в группе обработанных "АСГТ-11-фрагментом", было сделано предположение, что его последовательность может неспецифически регулировать концентрацию 28S рРНК (Плугатарь, Гальчинский и др., 2025а).

АСГТ-11-фрагмент в своей конструкции содержит CpG мотивы, которые как известно, активируют врожденный иммунитет хозяина против летальных воздействий от широкого спектра патогенов (Krieg, 2002). Очевидно, CpG мотивы способны генерировать «неожиданные» эффекты (Oberemok et al., 2017) и не должны использоваться в качестве контроля; однако они расширяют наше понимание действия олигонуклеотидов на насекомое. В любом случае они не вызывали значительной гибели насекомых при использовании в составе случайного олигонуклеотида "АСГТ-11" (Плугатарь, Гальчинский и др., 2025а).

3.4 Биологическая эффективность олигонуклеотидного инсектицида АВЖЕЧ-11 в отношении личинок австралийского желобчатого червеца

Известно, что для борьбы с австралийским желобчатым червцом используют органофосфаты и нефтяные масла. Ингибитор синтеза хитина ибупрофезин эффективен в отношении молодых нимф, но не действует на взрослых вредителей (Tozlu et al., 2020). В то время как использование насекомого-хищника божьей коровки *Rodolia cardinalis* продемонстрировало значительный потенциал в контроле популяций австралийского желобчатого червеца (Hoddle et al., 2013; Ak et al., 2017), активность естественных врагов снижается за счет применения фермерами инсектицидов широкого спектра действия, поскольку при этом погибают и естественные хищники, и их жертвы.

На сегодняшний день одним из наиболее эффективных и адресных методов уничтожения насекомых-вредителей подотряда Sternorrhyncha является использование олинцидов (Oberemok et al., 2020; Useinov et al., 2020; Oberemok et al., 2023; Puzanova et al., 2023; Oberemok et al., 2024а). Исходя из

этого, был разработан антисмысловой олинцид длиной 11 нуклеотидов (5'-ACACCGACGAC-3', АВЖЕЧ-11) на основе гена 28S рРНК австралийского желобчатого червеца (Gal'chinsky et al., 2023a).

С разработанным АВЖЕЧ-11-олинцидом были проведены исследования в природных условиях в арборетуме Никитского ботанического сада. Эксперимент был проведён в 3-х повторностях, от 100 до 120 личинок для одной повторности каждого варианта эксперимента, в период с октября 2020 года по февраль 2021 года. В ходе трёх независимых экспериментов было обработано около 3200 личинок первого и второго возраста, которые были включены в статистические расчеты для оценки выживаемости. Для данного эксперимента было отобрано 9 деревьев смолосемянника обыкновенного *P. tobira* высотой 4–5 м. Было использовано по 3 дерева на каждую группу эксперимента: контрольная группа (вода), группа "АВЖЕЧ-11" и группа "Тиаметоксам" (неоникотиноидный инсектицид, использован в качестве стандарта).

Чтобы оценить возможность того, что действие АВЖЕЧ-11 будет происходить через механизмы, характерные для РНКазы Н-зависимых олигонуклеотидов (Dias and Stein, 2002; Gal'chinsky et al., 2024a; Oberemok et al., 2025c), был использован метод ПЦР с праймерами, специфичными для гена 28S рРНК, в ходе которого был получен ампликон на основе выделенной тотально РНК *I. purchasi*. Для дальнейшего анализа ампликона, полученного методом ПЦР, было проведено его секвенирование, чтобы определить последовательность ампликона и подтвердить его соответствие целевой области гена 28S рРНК (Gal'chinsky et al., 2023a).

Секвенирование фрагмента гена 28S рРНК *I. purchasi* было выполнено с помощью пары праймеров Авжеч28S-F (5'-AGG-АТТ-САС-АСГ-ГТГ-ГАГ-ТС-3') и Авжеч28S-R (5'-GCA-AGT-GCA-CAA-СТТ-ГАА-СГ-3'). Эти праймеры образуют ампликон длиной 212 п.н. После удаления артефактов секвенирования была получена последовательность из 182 нуклеотидов, которая полностью совпадает (100%) с фрагментом гена 28S рРНК *I. purchasi* в базе данных GenBank (номер записи AY427432.1) (Рисунок 13).

AY427432.1³⁰⁶ TTTGTACGTA CTCTCGGTCGTCGGTGT TTTTCGTGGGCTGGT
I. purchasi TTTGTACGTA CTCTCGGTCGTCGGTGT TTTTCGTGGGCTGGT
 * * * * *

**Комплементарен АВЖЕЧ-11
 (3'-CAGCAGCCACA-5')**

AY427432.1³⁴⁴ AAACGCGGGCTCGGGTTATCGTTCAAGTTGTGCACTTGC
I. purchasi AAACGCGGGCTCGGGTTATCGTTCAAGTTGTGCACTTGC

Рисунок 13 – Выравнивание секвенированного фрагмента ДНК *I. purchasi*, собранного в природе, и фрагмента гена 28S рРНК *I. purchasi* из GenBank с использованием программы ClustalW 2.0.3; комплементарность последовательностей АВЖЕЧ-11 отмечена *

Это подтверждает, что в экспериментах на личинках *I. purchasi* использовался сайт-специфический олинцид, так как он совпал в области целевого сайта (диапазон: от 330 до 320). Последовательность из 182 нуклеотидов была загружена в систему GenBank под номером OR852410.1 (Приложение Ё).

Деревья вместе с находящимися на них личинками австралийского желобчатого червеца были контактно обработаны олинцидом в концентрации 1 мг/м² на листву растения. Уже на 3-и сутки в экспериментальной группе, обработанной АВЖЕЧ-11 (5'-ACA-CCG-ACG-AC-3'), было обнаружено, что смертность личинок значительно возросла по сравнению со смертностью личинок в контрольной (обработанной водой) группе ($\chi^2 = 53,567$, $p < 0,01$, $N = 724$, $df = 1$). В группах, обработанных водой, тиаметоксамом и АВЖЕЧ-11, была зафиксирована гибель личинок 14,02%, 28,67% и 42,92%, соответственно (Gal'chinsky et al., 2021; Гальчинский и др., 2023; Gal'chinsky et al., 2023a) (Таблица 3).

Таблица 3 – Динамика смертности личинок австралийского желобчатого червеца после контактной обработки водой, АВЖЕЧ-11-фрагментом и неоникотиноидным инсектицидом тиаметоксамом (0,8 г/л воды)

Сутки	Смертность, %		
	Контроль	Тиаметоксам	АВЖЕЧ-11
3-и	14,02 ± 2,79	28,67 ± 3,51*	42,92 ± 2,25*
7-е	20,08 ± 6,25	33,67 ± 2,52*	45,05 ± 4,74*
10-е	23,71 ± 8,87	35,33 ± 2,08	70,55 ± 0,77*

Примечание: достоверность различий смертности личинок в группах "АВЖЕЧ-11" и "Тиаметоксам" против контроля обозначена * при $p < 0,01$

На 10-е сутки после обработки было отмечено статистически значимое увеличение смертности насекомых, вызванное АВЖЕЧ-11-фрагментом, по сравнению с контрольной группой ($\chi^2 = 96,464$, $p < 0,01$, $N = 545$, $df = 1$). После обработки погибшие насекомые были обнаружены в следующем процентном соотношении: 23,71% (Контроль), 35,33% (Тиаметоксам) и 70,55% (АВЖЕЧ-11). В то же самое время в группе с тиаметоксамом по сравнению с контрольной группой был обнаружен умеренный инсектицидный эффект на третьи ($\chi^2 = 19,785$, $p < 0,01$, $N = 631$, $df = 1$) и десятые ($\chi^2 = 3,151$, $p > 0,05$, $N = 634$, $df = 1$) сутки (Гальчинский и др., 2023; Gal'chinsky et al., 2023a).

Применение олинцида АВЖЕЧ-11 оказалось высокоэффективным против *I. purchasi*, тогда как тиаметоксам оказал лишь умеренное инсектицидное действие. Таким образом, высокая эффективность олинцидов, а также их низкий углеродный след при производстве делают их привлекательными кандидатами для широкомасштабного использования для борьбы с вредителями, не способствуя изменению климата (Oberemok et al., 2024c; Oberemok et al., 2024d).

3.5 Влияние олигонуклеотидного инсектицида АВЖЕЧ-11 на концентрацию 28S рРНК в клетках австралийского желобчатого червеца

Специфичность действия олионцида АВЖЕЧ-11 была оценена путем анализа экспрессии 28S рРНК. Концентрация 28S рРНК у личинок, обработанных АВЖЕЧ-11, была снижена (в 1,4 раза) по сравнению с контролем на 3-и сутки и значительно снижена (в 6,4 раза) по сравнению с контролем на 7-е сутки, как показано на Рисунке 14.

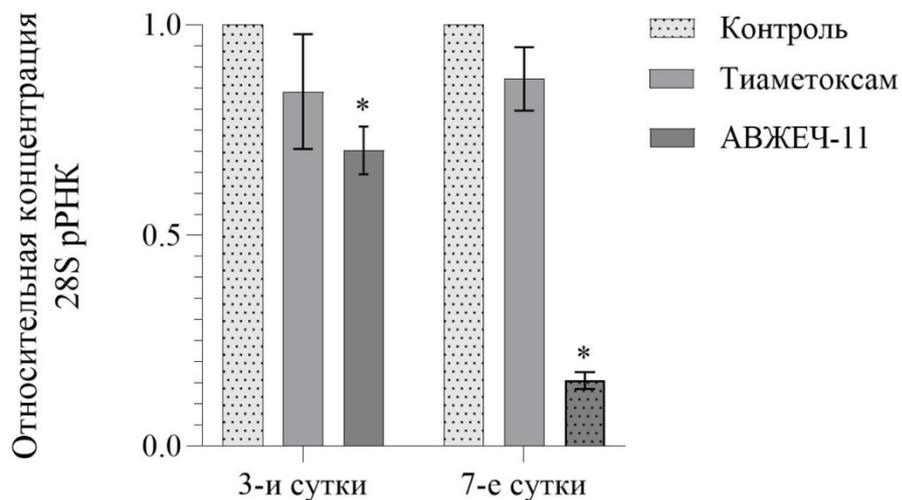


Рисунок 14 – Относительная концентрация 28S рРНК в личинках австралийского желобчатого червеца на третьи и седьмые сутки после обработки инсектицидом "Тиаметоксам" и "АВЖЕЧ-11". На Рисунке представлены средние значения и стандартные ошибки средних для трёх повторностей по сравнению с контрольной группой, обработанной водой. Достоверность различий по сравнению с контрольной группой была обнаружена только в группе "АВЖЕЧ-11" и обозначена * при $p < 0,01$

Полученные результаты доказывают, что целевая 28S рРНК была деградирована и что АВЖЕЧ-11-фрагмент уменьшал свою концентрацию как с помощью ДНК-управляемой РНКазы H, такой как РНКазы H1 (Dias and Stein, 2002; Gal'chinsky et al., 2024a; Oberemok et al., 2025c). Таким образом, в данном эксперименте олионцид АВЖЕЧ-11, рекрутирующий РНКазу H, был впервые

применен в борьбе с личинками *I. purchasi* (Гальчинский и др., 2023; Gal'chinsky et al., 2023a).

3.6 Биологическая эффективность олигонуклеотидных инсектицидов в отношении смешанной популяцией насекомых-вредителей семейства Diaspididae

3.6.1 Биологическая эффективность олигонуклеотидных инсектицидов в отношении смешанной популяции насекомых-вредителей *D. britannicus* и *A. lauri* в полевых условиях

Поскольку смешанные популяции насекомых-вредителей состояли из *D. britannicus* и *A. lauri*, был выбран фрагмент последовательности 28S рРНК, где они различались. Чтобы проверить, существуют ли данные генетические различия в этой смешанной популяции насекомых-вредителей в полевых условиях, было проведено секвенирование ДНК-фрагментов 28S рРНК каждого насекомого. Секвенирование фрагмента гена 28S рРНК лавровой щитовки *A. lauri* было выполнено с помощью пары праймеров Диасп28S-F (5'-CGA-AAC-CCG-TAC-ATG-TCG-3') и Диасп28S-R (5'-CGA-CGG-GCC-GTT-GAG-AC-3'). Эти праймеры образуют ампликон длиной 127 п.н. После удаления артефактов секвенирования была получена последовательность из 108 нуклеотидов, которая полностью совпадает (100%) с фрагментом гена 28S рРНК *A. lauri* в базе данных GenBank (номер записи KY219724.1) (Рисунок 15). Данный факт подтверждает, что в экспериментах на личинках *A. lauri* был использован сайт-специфический олинцид, так как он совпал в области целевого сайта (диапазон: от 454 до 444, олинцид ЛАУРИ-11) (Плугатарь, Гальчинский и др., 2025б; Gal'chinsky et al., 2024a). Последовательность из 108 нуклеотидов была загружена в систему GenBank под номером OR852409 (Приложение Ж).

KY219375.1 ⁴¹⁷CCGAGTACACGTTCCGCGATCGTCGGTATCGCGG
D. britannicus CCGAGTACACGTTCCGCGATCGTCGGTATCGCGG

Комплементарный олионциду БРИТ-11 участок

(3'-TAGCAGCCATA-5')

(3'-TAGCAACCGTA-5')

Комплементарный олионциду ЛАУРИ-11 участок

KY219724.1 ⁴²⁶CCGAGTACACGTTCCGCGATCGTCGGTATCGCGG
A. lauri CCGAGTACACGTTCCGCGATCGTTGGCATCGCGG

Рисунок 15 – Выравнивание секвенированных ДНК-фрагментов насекомых-вредителей (*D. britannicus* и *A. lauri*, собранных в природе) и фрагментов генов, кодирующих 28S рРНК (из GenBank), выполненное с использованием ClustalW 2.0.3

Произведено секвенирование фрагмента гена 28S рРНК британской щитовки *Dynaspidiotus britannicus* Newstead (обнаруженной на территории Крымского полуострова) с помощью пары праймеров Брит-F (5'-GCG-AAA-CCCGTA-CAT-GTC-3') и Брит-R (5'-ACG-ACT-GTC-CGC-ATC-AGC-3'), образующей ампликон длиной 145 п.н. Секвенированный фрагмент ДНК, состоящий из 108 нуклеотидов, полученный в результате удаления артефактов секвенирования, имеет совершенное перекрытие (100%) в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с фрагментом гена 28S рРНК *D. britannicus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY219375.1>), подтверждающим, что в экспериментах на личинках *D. britannicus* был использован сайт-специфический олионцид (диапазон: от 445 до 435, олионцид БРИТ-11). Последовательность из 108 нуклеотидов загружена в систему GenBank под номером OR897816 (Приложение 3). Полученные результаты секвенирования подтвердили данные различия представленные на Рисунке 15.

В смешанных популяциях насекомых-вредителей *D. britannicus* и *A. lauri* результаты секвенирования показали, что особи *A. lauri* с последовательностью 5'-ATC-GTT-GGC-AT-3' в участке 28S рРНК составляли 80% особей смешанных популяций, а 20% популяции составляли особи *D. britannicus* с

последовательностью 5'-АТС-GТС-GGT-АТ-3'. На основе данных знаний были созданы олинциды ЛАУРИ-11 (5'-АТG-ССА-АСG-АТ-3', против *A. lauri*) и БРИТ-11 (5'-АТА-ССG-АСG-АТ-3', против *D. britannicus*) с совершенной комплементарностью к каждой из последовательностей (Рисунок 15). Также были сделаны замены отдельных нуклеотидов в олинциде БРИТ-11, чтобы понять, какой нуклеотид будет играть наиболее важную роль в инсектицидном эффекте. В этой связи были созданы три последовательности с заменами отдельных нуклеотидов, трансверсии на 5'-конце – БРИТ(5')-11 (А на Т), на 3'-конце – БРИТ(3')-11 (Т на А) и в середине последовательности – БРИТ(6)-11 (6-е азотистое основание последовательности; G на С) соответственно. Каждая последовательность была синтезирована на ДНК-синтезаторе ASM800ET. Затем их использовали в качестве контактного олинцида, растворенного в воде (свободная от нуклеаз, РНКаз и ДНКаз) в концентрации 100 нг/мкл и нанесенных с помощью ручного распылителя на листья *L. nobilis* (мг олинцида на м² листьев), 10 мл раствора использовали на м². В качестве контроля использовали группу, обработанную водой. Около 8100 насекомых первого и второго личиночного возраста были обработаны в трёх независимых экспериментах по 120-130 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента, и их показатели выживаемости были рассчитаны статистически. Личинки были подсчитаны на 40 листьях *L. nobilis*, собранных случайным образом с разных сторон дерева, в каждой повторности каждого экспериментального варианта. Смертность регистрировали и рассчитывали на 3-и, 7-е, 10-е и 14-е сутки путем деления количества погибших особей на общее количество особей на листе и умножения на 100% (Плугатарь, Гальчинский и др., 2025б; Gal'chinsky et al., 2024a).

На 7-е сутки после обработки личинок олигонуклеотидными инсектицидами достоверное увеличение смертности насекомых по сравнению с контролем (вода) было обнаружено в следующих группах опыта: ЛАУРИ-11 ($\chi^2 = 166,495$, $p < 0,001$, $N = 444$, $df = 1$), БРИТ-11 ($\chi^2 = 175,209$, $p < 0,001$, $N = 727$, $df = 1$), БРИТ(5')-11 ($\chi^2 = 111,713$, $p < 0,001$, $N = 648$, $df = 1$), БРИТ(6)-11 ($\chi^2 = 55,421$, $p < 0,001$, $N = 668$, $df = 1$), БРИТ(3')-11 ($\chi^2 = 53,181$, $p < 0,001$,

N = 695, df = 1) и с тиаметоксамом ($\chi^2 = 390,174$, $p < 0,001$, N = 641, df = 1). В среднем на 7-е сутки погибло $3,38 \pm 0,22\%$, $64,64 \pm 1,75\%$, $51,59 \pm 13,87\%$, $30,76 \pm 2,91\%$, $25,86 \pm 5,83\%$, $23,47 \pm 0,29\%$ и $81,90 \pm 4,30\%$ личинок в группах, обработанных водой (контроль), ЛАУРИ-11, БРИТ-11, БРИТ(5')-11, БРИТ(6)-11, БРИТ(3')-11 и тиаметоксамом, соответственно (Плугатарь, Гальчинский и др., 2025б; Gal'chinsky et al., 2024a) (Рисунок 16).

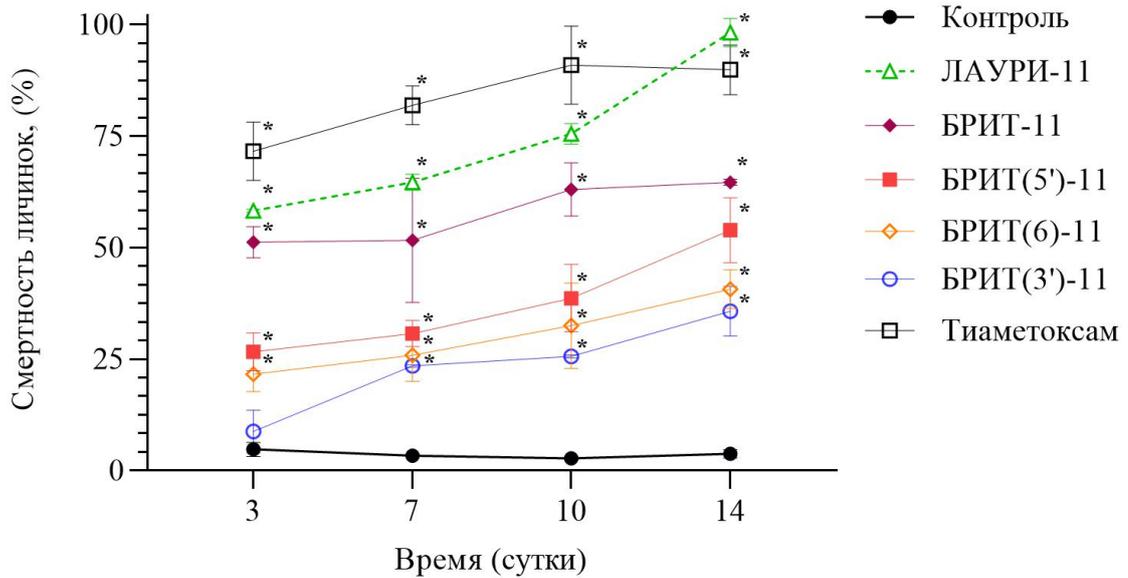


Рисунок 16 – Динамика смертности смешанной популяции (80%:20%) *A. lauri* и *D. britannicus* после контактной обработки водой, ЛАУРИ-11, БРИТ-11, БРИТ(5')-11, БРИТ(6)-11, БРИТ(3')-11 и тиаметоксамом. Значимость различий в группах по сравнению с контролем обозначена * при $p < 0,05$

На 14-е сутки эксперимента смертность в группах опыта увеличилась и достигла в контроле $3,77 \pm 0,94\%$, в ЛАУРИ-11 – $98,19 \pm 3,12\%$ ($\chi^2 = 317,645$, $p < 0,001$, N = 420, df = 1), в БРИТ-11 – $64,66 \pm 0,67\%$ ($\chi^2 = 216,170$, $p < 0,001$, N = 623, df = 1), в БРИТ(5')-11 – $53,89 \pm 7,25\%$ ($\chi^2 = 146,703$, $p < 0,001$, N = 661, df = 1), $40,68 \pm 4,33\%$ в БРИТ(6)-11 ($\chi^2 = 132,319$, $p < 0,001$, N = 606, df = 1), $35,74 \pm 5,51\%$ в БРИТ(3')-11 ($\chi^2 = 80,965$, $p < 0,001$, N = 683, df = 1) и $89,85 \pm 5,57\%$ в группе с тиаметоксамом ($\chi^2 = 424,328$, $p < 0,001$, N = 611, df = 1) (Gal'chinsky et al., 2023b; Плугатарь, Гальчинский и др., 2025б; Gal'chinsky et al., 2024a).

Олинцид ЛАУРИ-11 показал существенную эффективность по сравнению с тиаметоксамом. Учитывая природное происхождение олинцидов, данный подход может быть экологически чистой заменой неоникотиноидам и другим неселективным химическим инсектицидам, а также может стать основой для органического возделывания ряда сельскохозяйственных культур (Gal'chinsky et al., 2024a).

Обнаружено, что замена азотистого основания в последовательности олигонуклеотидного инсектицида БРИТ-11 на 5'-конце приводит к снижению его эффективности на 17%, а на 3'-конце – на 45%. Замена азотистого основания в 6-й позиции снизила эффективность на 37%. Как было обнаружено в предыдущих исследованиях, важнейшим правилом для получения максимального инсектицидного эффекта является полная комплементарность целевой последовательности рРНК и максимальное покрытие целевой последовательности в популяциях насекомых-вредителей (Oberemok et al., 2019a; Puzanova et al., 2023). На основе полученных результатов по смертности от примененных олигонуклеотидных инсектицидов было построено простое неравенство, описывающее, что комплементарность нуклеотида на 3'-конце к целевой 28S рРНК была наиболее важной для выраженного инсектицидного эффекта (значимость нуклеотидов для инсектицидного эффекта: $5' < (6) < 3'$). Таким образом, результаты демонстрируют, что при создании олигонуклеотидных инсектицидов важно обращать внимание на его последовательность на 3'-конце. Например, если в экосистеме со смешанными популяциями насекомых-вредителей также присутствуют полезные насекомые (в том числе полезные щитовки), необходимо создать олигонуклеотидный инсектицид, прежде всего, не совпадающий на 3'-конце с нецелевым организмом (правило 3'-конца олигонуклеотидных инсектицидов) (Gal'chinsky et al., 2024a).

Ранее в исследовании по борьбе с тлей было обнаружено, что нуклеотидные замены на 5'- и 3'-концах резко снижают инсектицидную эффективность олигонуклеотидных инсектицидов против *M. sanborni* (Puzanova et al., 2023). Напротив, щитовки показали, что их чувствительность к используемым

олигонуклеотидным инсектицидам зависит, прежде всего, от идеальной комплементарности их 3'-концов. Предполагается, что из-за малоподвижного образа жизни щитовок (Ross and Shuker, 2009), данные насекомые не вырабатывают столько энергии, сколько постоянно перемещающиеся тли (Tabadkani et al., 2013; Zhao et al., 2020). В связи с этим эффективность олинцидов также зависит от правила амплификации ДНК *in vitro*, основанного на температурной зависимости праймеров (Lorenz, 2012; Kayama et al., 2021): чем выше температура окружающей среды, тем выше должна быть комплементарность для стабильного образования дуплекса нуклеиновых кислот (ДНК-РНК). Поэтому считается, что для более подвижных тлей необходима полная комплементарность олинцидов, в то время как для щитовок идеальная комплементарность не так важна. Очевидно, что 3'-конец играет решающую роль в инсектицидном потенциале олинцида. При возникновении резистентности к олигонуклеотидным инсектицидам, можно применять различные стратегии. Как правило, новые олигонуклеотидные инсектициды можно создавать, смещая целевой сайт влево или вправо от сайта устойчивости 28S рРНК к олигонуклеотидному инсектициду (Gal'chinsky et al., 2024a; Gal'chinsky et al., 2024b).

Стратегия смещения целевого сайта (влево или вправо от участка устойчивости 28S рРНК к инсектициду) позволяет преодолевать резистентность вредителей за счёт изменения точки связывания олигонуклеотида с молекулой РНК (Рисунок 17). Смещение сайта даже на несколько нуклеотидов нарушает комплементарное взаимодействие с резистентным вариантом РНК, делая инсектицид вновь эффективным. Если у вредителя закрепились мутации в определённом участке 28S рРНК, новый олигонуклеотид нацеливается на сохранённые (немутированные) участки РНК.

Таким образом разработка алгоритмов «предсказания устойчивости» – с помощью биоинформатического анализа последовательностей рРНК у популяций вредителей можно заранее проектировать олигонуклеотиды, устойчивые к

мутациям. Это позволит создавать «препараты следующего поколения» с прогнозируемым сроком действия до появления резистентности.

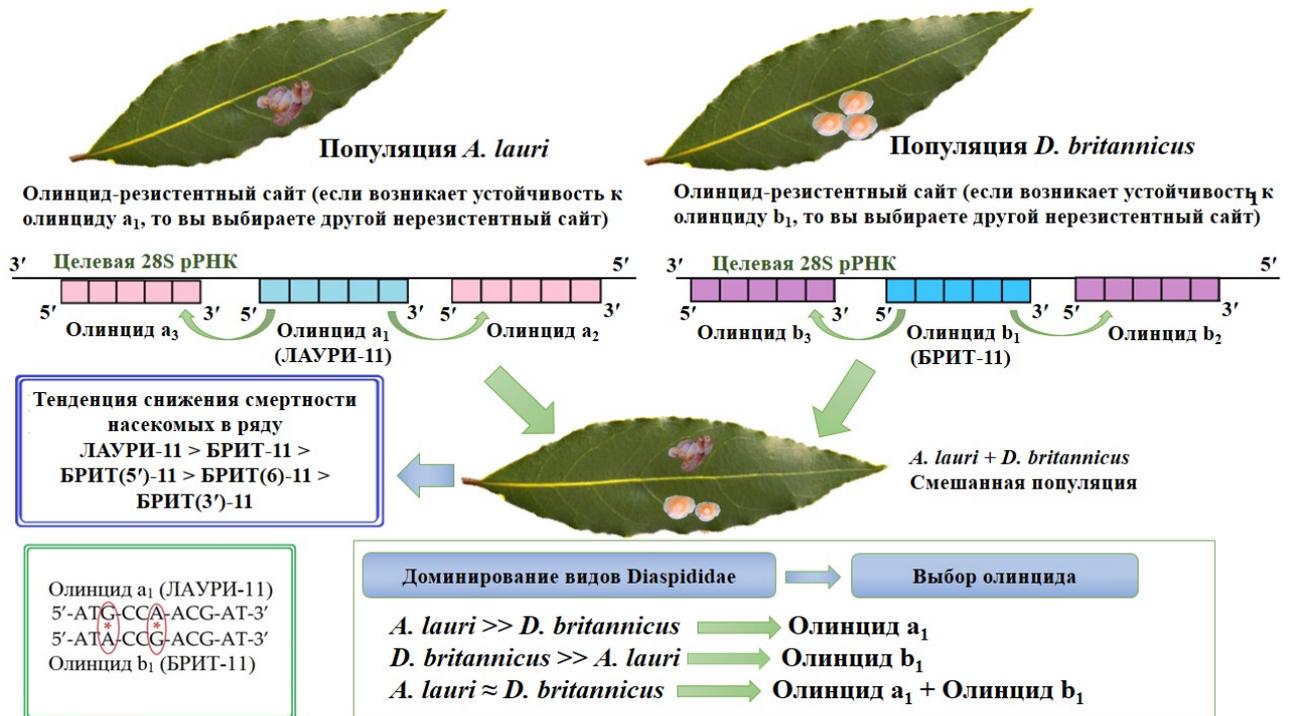


Рисунок 17 – Схема, отображающая биологическое обоснование подбора немодифицированных олигонуклеотидных инсектицидов для борьбы с насекомыми-вредителями в смешанных популяциях с учётом их генофонда на примере *D. britannicus* и *A. lauri*

Следует отметить, что на основании полученных данных прослеживается четкая тенденция снижения смертности насекомых в ряду ЛАУРИ-11 > БРИТ-11 > БРИТ(5')-11 > БРИТ(6)-11 > БРИТ(3')-11, и эта тенденция сохраняется на протяжении всего эксперимента (2 недели). Поскольку ЛАУРИ-11 и БРИТ-11 вызывают перекрестную смертность для *D. britannicus* (ЛАУРИ-11) и *A. lauri* (БРИТ-11), было сделано предположение, что между ДНК-олигондами и несовершенными комплементарными участками 28S рРНК нецелевых насекомых-вредителей могут происходить неканоническое спаривание оснований, аналогичное известным явлениям взаимодействия миРНК и мРНК, включая несовпадения А:С (С:А) и G:U (U:G). В частности, известно, что обнаруженные в нашем случае несовпадения А:С (С:А) хорошо переносятся и подавляются почти так же эффективно, как и их комплементарные (канонические спаривания)

аналоги (Du et al., 2005). Более того, также обнаруженное в нашем случае несовпадение G:T (T:G), очевидно, может играть важную роль в деградации целевой РНК, поскольку пары оснований, возможно, должны «дышать», чтобы произошло расщепление (Luige et al., 2022). Определенно, неканоническое спаривание оснований следует учитывать при дизайне олинцидов. Учитывая природное происхождение олинцидов, данный подход может быть экологически чистой заменой неоникотиноидов и других неселективных химических инсектицидов (Плугатарь, Гальчинский и др., 2025б; Gal'chinsky et al., 2024a).

Можно предположить, что создание олинцида для конкретного вредителя нанесет определенный вред нецелевым насекомым из-за неканонического спаривания азотистых оснований, однако данный процесс, во-первых, будет под контролем, что позволит минимизировать нежелательный эффект, подобрав оптимальную комбинацию азотистых оснований; во-вторых, ДНК будет быстро разрушаться в экосистемах, не нанося им существенного вреда. По сути, речь идет об управлении минимальными рисками для окружающей среды, и олинциды предоставляют такую возможность. Эта идея в принципе невыполнима для современных химических инсектицидов, что делает олинциды уникальным и перспективным подходом для защиты растений (Gal'chinsky et al., 2024a).

3.6.2 Влияние олигонуклеотидных инсектицидов на концентрацию 28S рРНК в личинках представителей семейства Diaspididae

Поскольку снижение экспрессии целевого гена является золотым стандартом для доказательства специфичности действия (Dias and Stein, 2002) антисмысловых олигонуклеотидов, была проведена оценка относительной концентрации 28S рРНК в смешанных популяциях личинок (*D. britannicus* и *A. lauri*) после обработки, что очень близко отражало результаты по смертности. На 5-е сутки во всех группах наблюдалось значительное увеличение концентрации целевой 28S рРНК, что согласуется с результатами измерения концентрации 28S рРНК мягкой ложнощитовки (рисунок 9, а), а затем снижение

концентрации 28S рРНК, характерное для антисмысловых олигонуклеотидов (Dias and Stein, 2002), наблюдалось на 10-е сутки по сравнению с 5-ми сутками (Gal'chinsky et al., 2024a) (Рисунок 18).

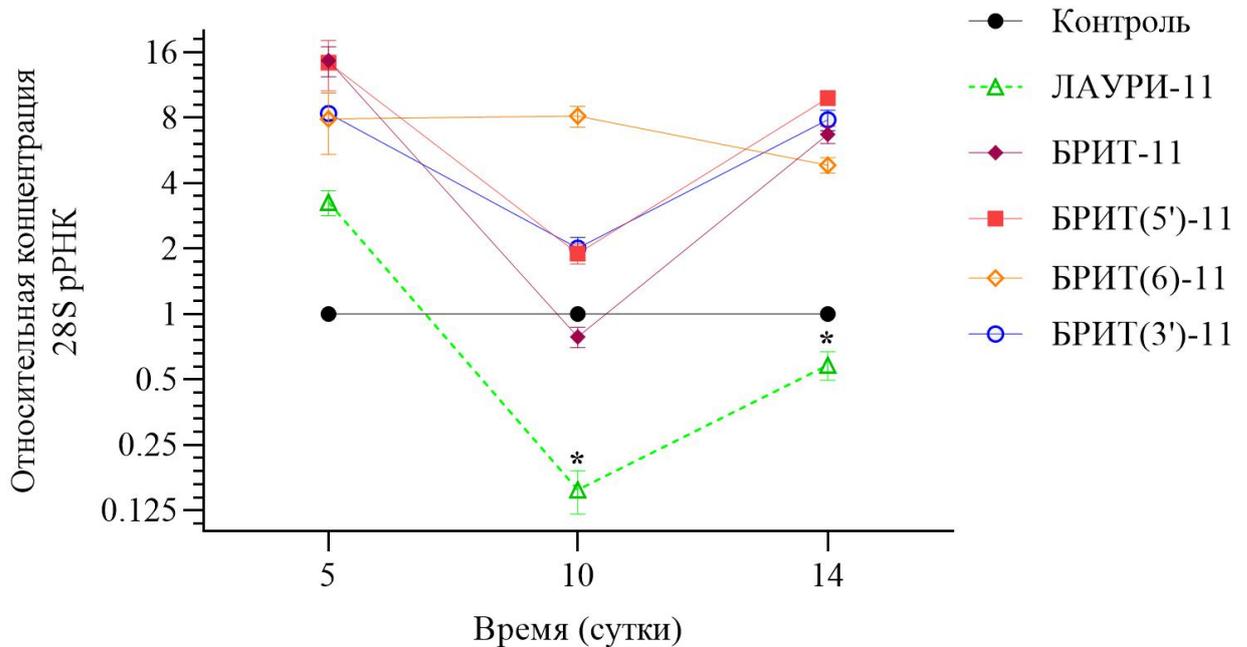


Рисунок 18 – Динамика относительной концентрации 28S рРНК (средняя концентрация) в смешанных популяциях насекомых-вредителей (*D. britannicus* и *A. lauri*) на 5-е, 10-е и 14-е сутки после обработки олигонуклеотидами ЛАУРИ-11, БРИТ-11, БРИТ(5')-11, БРИТ(6)-11 и БРИТ(3')-11

На Рисунке 18 представлены средние значения и стандартные ошибки средних для 3-х повторностей по сравнению с контрольной группой, обработанной водой. Контроль принят за 1 (100%). Значимость различий в группе ЛАУРИ-11 по сравнению с контрольной группой обозначена * при $p < 0,05$; средняя относительная концентрация означает, что в исследуемой массе насекомых есть особи с более низкой и более высокой концентрацией целевой рРНК по сравнению со средним значением (Gal'chinsky et al., 2024a).

Существенное снижение концентрации 28S рРНК между 5-ми и 10-ми сутками выстроилось в почти тот же ряд, что и для смертности: ЛАУРИ-11 > БРИТ-11 > БРИТ(5')-11 > БРИТ(3')-11 > БРИТ(6)-11. Наиболее значительное снижение концентрации 28S рРНК у насекомых было обнаружено

для наиболее эффективного олинцида ЛАУРИ–11 и было в $8,44 \pm 0,14$ и $1,72 \pm 0,36$ раза ниже по сравнению с контролем, обработанным водой, на 10-е и 14-е сутки, соответственно ($p < 0,05$, Рисунок 18) (Плугатарь, Гальчинский и др., 2025б; Gal'chinsky et al., 2024a).

3.6.3 Механизм действия олигонуклеотидных инсектицидов (механизм ДНК-сдерживания)

В ходе исследований было обнаружено, что олигонуклеотидные инсектициды действуют через механизм ДНК-сдерживания (ДНКс), который состоит из двух этапов. На первом этапе ДНКс антисмысловой ДНК-олигонуклеотид (олигонуклеотидный инсектицид) комплементарно взаимодействует с целевой рРНК (другими словами, «арестовывает» целевую рРНК) и мешает нормальному функционированию и биогенезу рибосом («арестованные» рибосомы); данный процесс сопровождается существенной смертностью насекомых-вредителей. После этого наблюдается гиперкомпенсация целевой рРНК ДНК-зависимой РНК-полимеразой как единственный способ для клетки насекомого бороться за жизнь в такой ситуации, когда целевые рРНК и/или полицистронные рРНК (пре-рРНК) транскрипты «арестованы» антисмысловыми ДНК-олигонуклеотидами. Как «старые» заблокированные целевые рРНК в рибосомах (рибосомы, по-видимому, не функционируют должным образом в данной ситуации), так и «новые» синтезированные целевые рРНК могут быть обнаружены с помощью ОТ-ПЦР РВ, и, таким образом, наблюдается гиперкомпенсацию целевой рРНК (Рисунок 18; 5-е сутки). На втором этапе РНКазы Н расщепляет целевую рРНК, и происходит существенное снижение ее концентрации; данный этап также сопровождается существенной смертностью насекомых-вредителей (Рисунок 18; 10-е сутки) (Gal'chinsky et al., 2024a).

К 14-м суткам в живых остаются те особи, у которых наблюдалось увеличение концентрации целевой рРНК в клетках (по сравнению со средним

числом, обнаруженным на 10-е сутки) (Рисунок 18, 14-е сутки). Логично, что увеличение концентрации целевой рРНК лучше, чем ее уменьшение по сравнению с контролем. Однако при наличии достаточной концентрации антисмысловых ДНК-олигонуклеотидов (олинцидов) эта гиперкомпенсация не спасает и будет наблюдаться следующий цикл деградации целевой рРНК. Следует отметить, что гиперкомпенсация целевой рРНК, а затем существенное снижение вновь синтезированной целевой рРНК, сопровождающееся выраженной смертностью насекомых, ранее наблюдалось для олинцида КОККУС-11 на *C. hesperidum* (Гальчинский, 2025а). Назван данный двухэтапный процесс как механизм ДНК-сдерживания (Gal'chinsky et al., 2024а; Gal'chinsky and Oberemok, 2024) (Рисунок 19).

Полученные данные свидетельствуют о том, что механизм ДНКс может участвовать в регуляции экспрессии рРНК комплементарной геномной ДНК (прямая регуляция рРНК хозяина) и вирусной ДНК (механизм коммутатора синтеза рРНК) (Oberemok et al., 2025с), а также может быть задействован в системе врожденного иммунитета (Gal'chinsky et al., 2024а) против одноцепочечных ДНК-вирусов, для которых полужесткокрылые насекомые служат основными переносчиками (Wang and Blanc, 2021; Wu et al., 2022), а также против ДНК-вирусов, которые обычно их инфицируют (Guo et al., 2022).

Очевидно, что нуклеазы насекомых расщепляют специфические последовательности ДНК захватчика, производя одноцепочечные ДНК-олигонуклеотиды, и впоследствии инициируют деградацию целевых вирусных РНК через механизм ДНК-сдерживания (Рисунок 19).

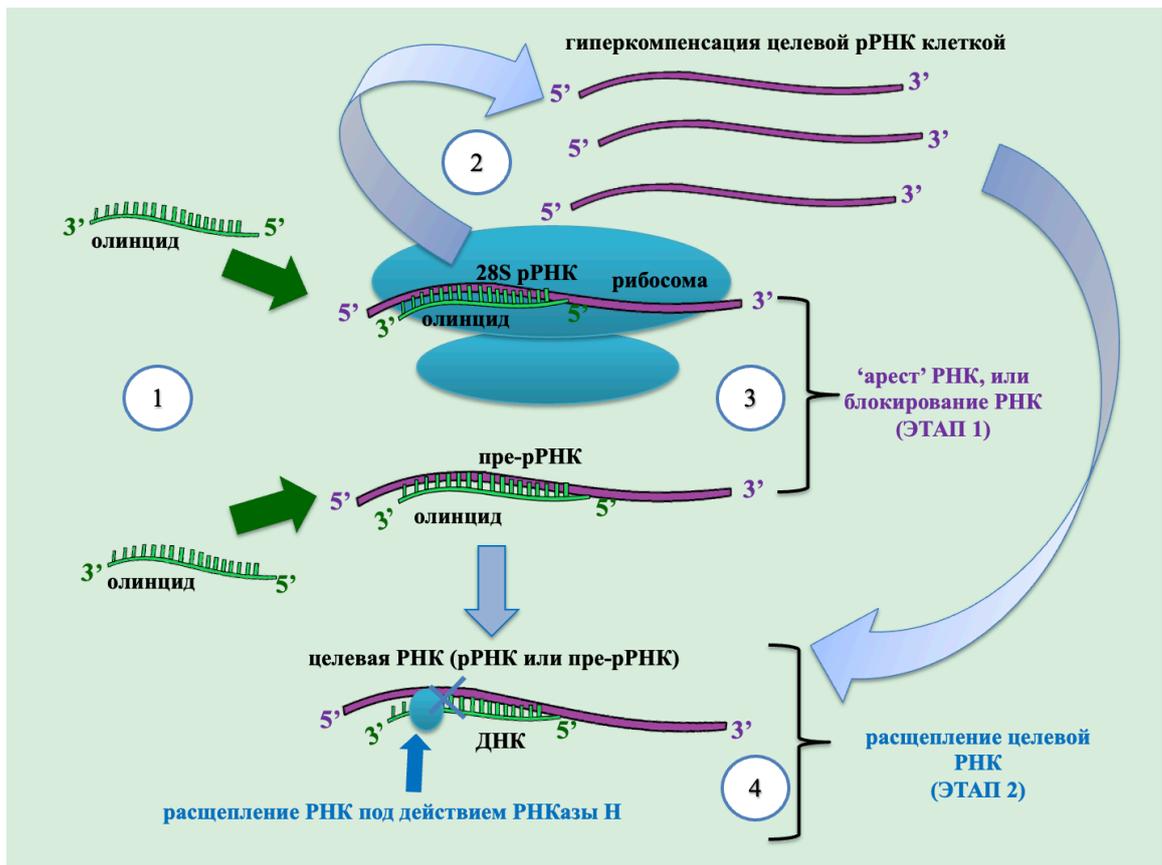


Рисунок 19 – ДНК-сдерживание является основным механизмом действия олигонуклеотидных инсектицидов:

- 1 – в качестве олигонуклеотидных инсектицидов используют антисмысловые последовательности ДНК, комплементарные рРНК и/или пре-рРНК насекомых-вредителей;
- 2 – образование дуплекса между ДНК (олигонуклеотидный инсектицид) и РНК (рРНК и/или пре-рРНК) вредителей;
- 3 – на первом этапе ДНКс олигонуклеотидный инсектицид «арестовывает» целевую рРНК и/или пре-рРНК, что приводит к ее гиперкомпенсации и нарушает нормальное функционирование и биогенез рибосом («арестованные» рибосомы);
- 4 – на втором этапе ДНКс происходит ферментативное расщепление рРНК с помощью ДНК-управляемой РНКазы Н, такой как РНКазы Н1, что приводит к существенному снижению её концентрации

3.7 Биологическая эффективность олигонуклеотидного инсектицида БРИТ-11 в отношении личинок британской щитовки

Дополнительно был проведён эксперимент по оценке смертности личинок первого и второго возраста британской щитовки после обработки ДНК-олигонуклеотидами на модельных участках парковых насаждениях лавра благородного *L. nobilis* арборетума Никитского ботанического сада. По результатам четырехлетних исследований установлена высокая биологическая эффективность БРИТ-11-фрагмента. Инсектицидный эффект БРИТ-11-фрагмента в концентрации 0,1 г/л воды наблюдался при контактном попадании олигонуклеотида на личинок (Gal'chinsky et al., 2020) (Таблица 4). Эксперимент был проведён в трёх повторностях по 340-350 особей для одной повторности каждого варианта эксперимента.

Таблица 4 – Динамика смертности личинок британской щитовки после их контактной обработки водой, БРИТ-11-фрагментом, олигоС-11-фрагментом (контрольный фрагмент; 5'-ССС-ССС-ССС-СС-3').

Сутки	Смертность, %		
	Контроль	олигоС-11	БРИТ-11
4-е	24,45 ± 4,14	31,74 ± 3,71	51,36 ± 20,92
7-е	27,13 ± 3,60	31,40 ± 4,17	62,63 ± 23,03**
10-е	25,81 ± 4,34	35,01 ± 3,88	82,44 ± 15,62**
14-е	29,32 ± 3,33	38,78 ± 1,10*	85,13 ± 10,31**

Примечание: достоверность смертности насекомых в группах "БРИТ-11" и "олигоС-11" против контроля обозначена * при $p < 0,05$; ** при $p < 0,01$

На четвертые, седьмые и десятые сутки после обработок личинок британской щитовки БРИТ-11-фрагментом наблюдались показатели в 51,36 ± 20,92%, 62,63 ± 23,03% и 82,44 ± 15,62% биологической эффективности. Процент погибших личинок насекомого на четырнадцатые сутки эксперимента составил в среднем 85,13 ± 10,31% в группе "БРИТ-11", 38,78 ± 1,10% в группе

"олигоС-11", и $29,23 \pm 3,33\%$ в контрольной группе, обработанной водой. Достоверность в смертности по сравнению с контролем была найдена на седьмые, десятые и четырнадцатые сутки в группе "БРИТ-11" ($\chi^2 = 407,1$, $p < 0,001$, $N = 1589$, $df = 1$; $\chi^2 = 478,511$, $p < 0,01$, $N = 1751$, $df = 1$; $\chi^2 = 570,787$, $p < 0,001$, $N = 1838$, $df = 1$). Нужно отметить, что естественное происхождение олигонуклеотидных фрагментов делает их серьезными конкурентами химическим инсектицидам (Gal'chinsky et al., 2020).

3.8 Влияние олигонуклеотидного инсектицида БРИТ-11 на концентрацию 28S рРНК в клетках личинок британской щитовки

Концентрация 28S рРНК у насекомых, обработанных БРИТ-11-фрагментом, была на четвертые сутки значительно ниже (в 3,51 раза) по сравнению с контролем, обработанных водой ($p < 0,01$, Рисунок 20). Таким образом, РНКазы Н-зависимая деградация 28S рРНК важной части белоксинтезирующего комплекса синтеза белка, поддерживаемая БРИТ-11-фрагментом, была достаточно эффективной (Gal'chinsky et al., 2020).

Было получено снижение концентрации 28S рРНК на 71%, что соответствует достоверному увеличению смертности от контактного применения БРИТ-11-фрагмента (Рисунок 20). Более того, на четвертые сутки эксперимента наблюдалась картина, характерная для действия рекрутирующего РНКазы Н антисмыслового олигонуклеотида БРИТ-11, со снижением экспрессии целевой рРНК характерным для 2-го шага механизма ДНКс. Таким образом, достоверное снижение экспрессии целевого гена 28S рРНК соответствует механизму действия антисмысловых олигонуклеотидов, когда можно с уверенностью утверждать специфику инсектицидного эффекта, вытекающего из комплементарного взаимодействия БРИТ-11-фрагмента с целевой рРНК, а в последствии – её разрушении с участием РНКазы Н (Dias and Stein, 2002; Oberemok et al., 2025c).

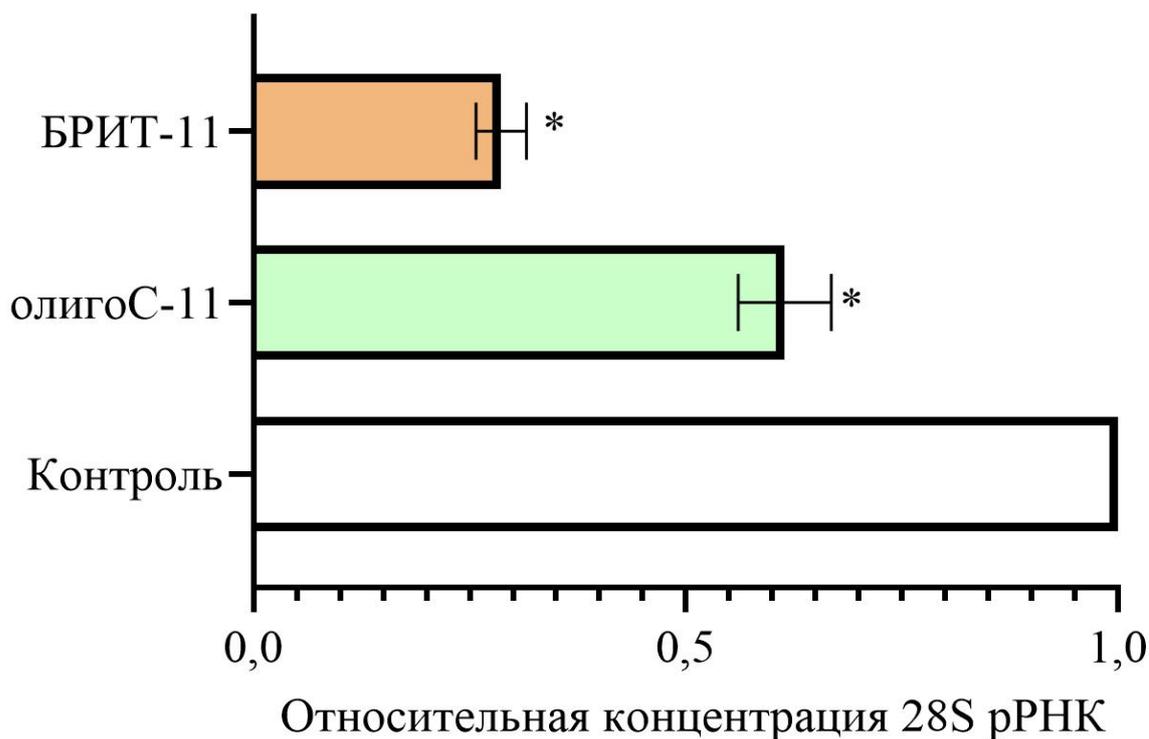


Рисунок 20 – Относительная концентрация 28S рРНК в личинках британской щитовки на четвертые сутки после обработки олигонуклеотидами. На графике представлены средние значения и стандартные ошибки средних для трёх повторностей по сравнению с контрольной группой, обработанной водой. Достоверность различий между группой "БРИТ-11", "олигоС" и контрольной группой (вода) обозначена * при $p < 0,01$

3.9 Биологическая эффективность олигонуклеотидных инсектицидов ЛАУРА-11 и АЛАКРИС-11 в отношении лавровой листоблошки

На 3-и сутки эксперимента значительная смертность насекомых-вредителей, $67,61 \pm 3,09\%$ и $14,28 \pm 1,61\%$, наблюдалась после обработки растений лавра благородного олинцидами ЛАУРА-11 и АЛАКРИС-11, соответственно ($p < 0,05$). Также наблюдалась значительная смертность насекомых-вредителей, $46,86 \pm 0,74\%$, на 3-и сутки при использовании смеси олинцидов (АЛАКРИС-11 и ЛАУРА-11) 1:1 ($p < 0,05$). Максимальная смертность личинок лавровой листоблошки наблюдалась на 14-е сутки эксперимента. Смертность составила $95,01 \pm 4,42\%$ для группы с олинцидом АЛАКРИС-11, $97,16 \pm 2,49\%$ для группы с

олинцидом ЛАУРА-11 и $98,72 \pm 1,14\%$ для группы с их смесью 1:1 ($p < 0,05$) (Oberemok et al., 2024e) (Таблица 5).

Таблица 5 – Динамика смертности лавровой листоблошки после контактной обработки водой и олигонуклеотидными инсектицидами

Сутки	Смертность, %				
	Контроль	СТГА-11	АЛАКРИС-11	ЛАУРА-11	ЛАУРА-11 + АЛАКРИС-11 (1:1)
3-и	$3,38 \pm 0,28$	$4,94 \pm 0,63$	$14,28 \pm 1,61^*$	$67,61 \pm 3,09^*$	$46,86 \pm 0,74^*$
8-е	$5,81 \pm 0,88$	$5,73 \pm 0,55$	$46,91 \pm 12,03^*$	$75,12 \pm 2,44^*$	$50,49 \pm 1,83^*$
10-е	$7,11 \pm 0,78$	$7,26 \pm 0,41$	$68,05 \pm 1,61^*$	$85,02 \pm 3,49^*$	$68,79 \pm 4,73^*$
14-е	$9,45 \pm 0,41$	$9,38 \pm 0,57$	$95,01 \pm 4,42^*$	$97,16 \pm 2,48^*$	$98,72 \pm 1,14^*$

Примечание: достоверность различий смертности насекомых в опытных группах против контроля обозначена * при $p < 0,01$

Следует отметить, что олинцид ЛАУРА-11 показал более выраженный инсектицидный эффект, чем АЛАКРИС-11. Как и ожидалось, случайный олигонуклеотид СТГА-11 не показал какого-либо значительного инсектицидного эффекта на протяжении всего эксперимента. Смертность от применения случайного олигонуклеотида СТГА-11 соответствовала нормальной смертности в группе контроля (Таблица 5), обработанным водой, и составила $9,39 \pm 0,57\%$ и $9,45 \pm 0,41\%$ в группе СТГА-11 и Контроле, на 14-е сутки эксперимента соответственно ($p > 0,05$) (Oberemok et al., 2024e).

В ходе эксперимента также исследовали экспрессию целевой рРНК. На 3-и сутки эксперимента наблюдалась гиперкомпенсация целевой рРНК для всех примененных олинцидов (1-й шаг механизма ДНКс) (Gal'chinsky et al., 2024a). По сравнению с контролем экспрессия целевой рРНК увеличилась в $3,56 \pm 0,66$ раза и $2,93 \pm 0,16$ раза для олигонуклеотидного инсектицида ЛАУРА-11 и олигонуклеотидного инсектицида АЛАКРИС-11 соответственно; и была в

5,52 ± 0,13 раза выше по сравнению с обработанной водой контролем для их смеси 1:1 (Oberemok et al., 2024e) (Таблица 6).

Таблица 6 – Относительная концентрация целевой рРНК в личинках *T. alacris* после обработки ДНК-олигонуклеотидами

Сутки	Целевая концентрация рРНК		
	ЛАУРА-11	АЛАКРИС-11	ЛАУРА-11 + АЛАКРИС-11 (1:1)
3-и	3,56 ± 0,66	2,93 ± 0,16	5,52 ± 0,13
8-е	0,21 ± 0,01	1,35 ± 0,01	0,64 ± 0,02
10-е	0,004 ± 0,0001	0,92 ± 0,03	0,01 ± 0,0004
14-е	0,058 ± 0,05	7,19 ± 0,19	0,0003 ± 0,00002

Примечание: контроль принят за 1 (100%)

На 8-е и 10-е сутки эксперимента наблюдалась картина, характерная для действия рекрутирующего РНКазу Н антисмыслового олигонуклеотида со снижением экспрессии целевой рРНК по сравнению с 3-ми сутками (2-й шаг механизма ДНКс). На 14-е сутки эксперимента экспрессия целевой рРНК начала увеличиваться в группах ЛАУРА-11 и АЛАКРИС-11, тогда как в группе их смеси 1:1 экспрессия целевой рРНК была существенно снижена. Все колебания уровней экспрессии в опытных группах достоверно отличались от таковых в контрольной группе ($p < 0,05$) (Таблица 6). В целом, обнаруженная экспрессия целевой рРНК после применения олигонуклеотидных инсектицидов соответствует схеме механизма ДНКс (Gal'chinsky et al., 2024a; Oberemok et al., 2025c). Как было показано в предыдущих экспериментах на смешанных популяциях насекомых-вредителей, выжившие щитовки после 1-го цикла механизма ДНКс имеют тенденцию к сверхэкспрессии целевой рРНК (Gal'chinsky et al., 2024a) и иницированию 2-го цикла ДНКс. Интересно, что смесь 1:1 ЛАУРА-11 и АЛАКРИС-11 вызвала наиболее выраженную деградацию целевой рРНК у вредителя, не позволяя иницировать 2-й цикл ДНКс у

выживших насекомых, обнаруженную для других экспериментальных групп на 14-е сутки (Oberemok et al., 2024e) (Таблица 6).

Полученные результаты свидетельствуют о возможности разработки олинцидов против *D. citri* и других экономически важных представителей надсемейства Psylloidea. С одной стороны, использование рРНК в качестве мишени позволяет генерировать в клетке мощный инсектицидный сигнал, а с другой стороны, гены рРНК насекомых обладают достаточной вариабельностью, особенно ITS-области, для создания программируемых видоспецифичных, родоспецифичных и семействоспецифичных последовательностей олигонуклеотидных инсектицидов (Oberemok et al., 2024e). Следует отметить, что олигонуклеотидные инсектициды АЛАКРИС-11 и ЛАУРА-11 также могут быть использованы против других видов надсемейства Psylloidea, имея полное совпадение последовательностей с ними. Например, олинцид АЛАКРИС-11 может быть успешно использован против оливковой листоблошки *Euphyllura olivina* Costa (семейство Liviidae) (идентификатор последовательности GenBank: MT038970.1; диапазон: 388–378). *E. olivina* считается одним из самых опасных вредителей, поражающих оливковые деревья в Средиземноморье, Палестине (Hamdan et al., 2016) и регионе Таро в Иране (Khaghaninia, 2009). Также олинцид Alacris-11 может быть использован против томатной листоблошки *Bactericera cockerelli* Šulc (семейство Triozidae) (идентификатор последовательности GenBank: MT027594.1; диапазон: 734–724). *B. cockerelli* является важным насекомым-вредителем картофеля, томатов и других пасленовых культур (Sarkar et al., 2023). Олинцид ЛАУРА-11 может быть использован против *T. remota* Foerster (семейство Triozidae) (идентификатор последовательности GenBank: MT038993.1; диапазон: 321–311). *T. remota* – вредитель, который создает галлы на листьях дуба (вид *Quercus*) (Redfern et al., 2011). Таким образом, метод «генетической застёжки-молнии» – это не просто инновация, но и алгоритм, который с высокой степенью вероятности вычисляет эффективность конкретного олинцида не только для целевого вредителя-насекомого, но и для близкородственных видов, имеющих

идеальную комплементарность с разработанным олионцидом (Oberemok et al., 2024e).

Следует отметить, что олионциды могут быть разработаны с помощью программы DNAINsector (dnainsector.com) или вручную с использованием последовательностей рРНК вредителей, найденных в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Все эти характеристики делают олионциды «легкими инсектицидами», а метод «генетической застёжки-молнии» воспринимается как легко настраиваемый алгоритм для защиты растений. Более того, короткие последовательности обеспечивают преимущества с точки зрения более высокого выхода синтеза с использованием фосфорамидитного метода, что приводит к увеличению массы продукта и снижению производственных затрат. Олионциды действуют преимущественно как контактные, а не системные инсектициды. Несмотря на отсутствие выраженной системной активности, они высокоэффективны благодаря точному воздействию на важные последовательности рРНК вредителя, что в итоге приводит к его гибели (Oberemok et al., 2025c). Полученные данные свидетельствуют о том, что вредители не способны компенсировать последствия действия коротких олигонуклеотидных инсектицидов, что, по-видимому, приводит к истощению запасов АТФ и «киназной катастрофе», приводящей к гибели клетки (Oberemok et al., 2025c). Внедрение метода «генетической застёжки-молнии» на основе КВАДб в защиту растений может привести к созданию высокоадаптируемой платформы для разработки олигонуклеотидных инсектицидов в ответ на генетические изменения вредителей в процессе микроэволюции. Основная цель – сохранение урожайности сельскохозяйственных культур при минимизации воздействия на окружающую среду – остаётся центральной в данном подходе. Согласно нашим последним прогнозам, данный метод также экономически целесообразен для крупномасштабного внедрения в сельском хозяйстве. Химические инсектициды остаются доминирующими в борьбе с вредителями (Araújo et al., 2023), и вредители постепенно вырабатывают устойчивость к ним, обусловленную естественным отбором посредством

случайных мутаций; это вызывает серьёзную озабоченность с середины XX века (Skendžić et al., 2021; Lazarević-Pašti et al., 2025).

РАЗДЕЛ 4 СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ

4.1 Сравнительный анализ результатов применения олигонуклеотидных инсектицидов

Одной из главных задач исследования являлось сопоставление показателей инсектицидного потенциала 11-мерных олигонуклеотидных инсектицидов, КОККУС-11, ЯВОЛ-11, АВЖЕЧ-11, ЛАУРИ-11, БРИТ-11, ЛАУРА-11 и АЛАКРИС-11 на основе их влияния на жизнеспособность насекомых-вредителей *C. hesperidum*, *C. japonicus*, *I. purchasi*, *A. lauri*, *D. britannicus* и *T. alacris* (Гальчинский и др., 2023; Гальчинский, 2025а; Плугатарь, Гальчинский и др., 2025а; Плугатарь, Гальчинский и др., 2025б; Gal'chinsky et al., 2020; Gal'chinsky et al., 2023а; Gal'chinsky et al., 2024а; Oberemok et al., 2024е). В результате проведенных исследований на данных насекомых-вредителях в период с 2020 по 2022 годы был рассчитан средний показатель биологической эффективности олигонуклеотидных инсектицидов, выраженный в процентах средней смертности насекомых. Это связано с тем, что для олигонуклеотидных инсектицидов действующим веществом является дезоксирибонуклеиновая кислота (Гальчинский, 2025б).

В результате выполнения расчетов было установлено, что со 2-х по 4-е сутки в группе опыта после обработки олигонуклеотидными инсектицидами наблюдается увеличение смертности насекомых в среднем $43,35 \pm 21,11\%$ по сравнению со смертностью $8,99 \pm 8,62\%$ в контрольной группе, обработанной водой ($p < 0,01$) (Рисунок 21). К середине эксперимента происходит значительное увеличение смертности вредителей, наблюдаемое между шестыми и девятыми сутками. В среднем $67,54 \pm 17,78\%$ и $11,19 \pm 8,91\%$ погибших насекомых в группах, обработанных олигонуклеотидными инсектицидами и водой соответственно ($p < 0,01$). В конце эксперимента с 10-х по 14-е сутки, как правило, смертность насекомых, обработанных олигонуклеотидными инсектицидами, достигает своего плато, в

среднем $81,81 \pm 12,57\%$ по сравнению со смертностью $13,96 \pm 10,61\%$ в контрольной группе, обработанной водой ($p < 0,01$).

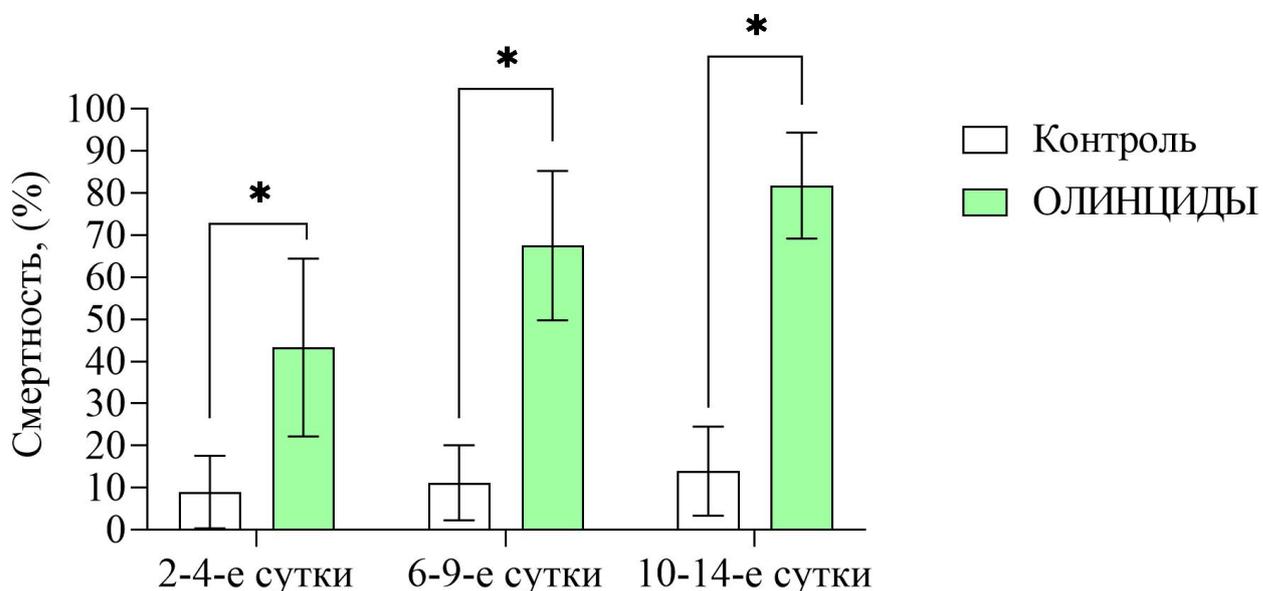


Рисунок 21 – Сопоставление показателей биологической эффективности олигонуклеотидных инсектицидов в период с 2020 по 2022 годы, выраженные в процентах средней смертности насекомых-вредителей *C. hesperidum*, *C. japonicus*, *I. purchasi*, *A. lauri*, *D. britannicus* и *T. alacris*. Достоверность смертности насекомых против контроля обозначена * при $p < 0,01$

Таким образом, в данных исследованиях на насекомых-вредителях из подотряда грудохоботных, в частности, *C. hesperidum*, *C. japonicus*, *I. purchasi*, *A. lauri*, *D. britannicus* и *T. alacris*, впервые была показана возможность контроля численности данных насекомых с помощью применения олигонуклеотидных инсектицидов, которые вызывают существенную гибель насекомых. Полученные результаты демонстрируют высокую перспективность данного подхода, поскольку олигонуклеотидные инсектициды обладают таргетным действием, минимизируя воздействие на нецелевые организмы и окружающую среду. Это открывает возможности для разработки экологически безопасных средств защиты растений особенно в условиях растущей резистентности вредителей к традиционным химическим препаратам. Дальнейшие исследования в данном

направлении могут способствовать созданию новых высокоспецифичных инструментов для устойчивого сельского хозяйства (Гальчинский, 2025б).

4.2 Экономические перспективы внедрения олигонуклеотидных инсектицидов в защиту растений

В эпоху стремительного развития технологий и осознанного подхода к защите природы современное устойчивое сельское хозяйство активно внедряет инновационные методы защиты растений. Одним из таких передовых решений на западном рынке становится технология РНКи, которая открывает новые горизонты в борьбе с вредителями растений. Остановимся подробнее на РНК-инсектицидах и олигонуклеотидных инсектицидах.

4.2.1 РНК-инсектициды

Объем мирового рынка РНКи пестицидов оценивался в 1,2 млрд долларов США в 2024 году и, по прогнозам, достигнет 4,6 млрд долларов США к 2034 году при среднегодовом темпе роста 14,2% в прогнозируемый период с 2025 по 2034 годов (Insight Ace, 2025). В настоящее время ЕС пересматривает свои правила в отношении пестицидов, чтобы определить, в достаточной ли степени они охватывают новую категорию пестицидов РНКи, при этом растет поддержка специальной нормативной базы для оценки потенциальных рисков и преимуществ данной технологии. Одновременно Агентство по охране окружающей среды США (EPA) предлагает трёхлетнее одобрение нового биопестицида на основе РНКи для борьбы с колорадским жуком на картофельных культурах. Это сигнализирует о том, что пестициды РНКи приближаются к одобрению в США, что отражает растущий глобальный интерес к этим инновационным решениям по борьбе с вредителями. Регулирующие органы, такие как EPA и Европейский союз, демонстрируют институциональную поддержку более безопасным и более устойчивым методам борьбы с вредителями. Постоянный прогресс в методах

доставки РНКи, таких как местное применение дцРНК, делает пестициды РНКи более практичными и эффективными, еще больше повышая их коммерческую жизнеспособность.

На сегодняшний день для получения дцРНК в экспериментальных условиях обычно используются три основных подхода. Синтез из нуклеозидтрифосфатов является быстро развивающейся технологией, при этом промышленные затраты составляют всего ~60 долларов за грамм (Zotti et al., 2018). Вторым подходом – это синтез *in vitro* с помощью РНК-зависимых РНК-полимераз. Набор MEGAscript™ RNAi (Thermo Scientific, США) позволяет производить дцРНК по цене ~3000 долларов за 10 мг. Третий вариант – это производство дцРНК путем ферментации. В этом процессе дцРНК синтезируется в трансгенных клетках. Ожидается, что последний станет наиболее доступным и экономически эффективным методом для крупномасштабного производства дцРНК в лабораторных условиях с целевыми затратами около 4 доллара за 1 г (Zotti et al., 2018). Тем не менее, эти цены еще не стали коммерчески обоснованными и реальные индивидуальные заказы на транскрипционные конструкции *in vitro* размером до 500 п.н. по-прежнему оцениваются в ≥ 500 долларов США за 10 мг (Verdonck and Vanden Broeck, 2022).

Однако некоторые продукты уже коммерциализированы, а другие находятся в разработке. Они предлагают потенциально более целенаправленный и экологически безопасный подход к борьбе с вредителями по сравнению с традиционными химическими пестицидами. Хотя ранние затраты на производство РНК были высокими, достижения в области бесклеточных платформ производства РНК значительно снизили затраты, сделав коммерциализацию осуществимой. Одним из таких продуктов является Calantha, разработанный компанией GreenLight Biosciences. Это первый пестицид на основе РНКи, вышедший на рынок. Согласно данным GreenLight Biosciences, прогнозируемая себестоимость его производства составляет менее 1 доллара за грамм (GreenLight Biosciences, 2025).

В то время как мировой рынок демонстрирует прогресс в снижении себестоимости, ситуация в России имеет свою специфику. На сегодняшний день стоимость синтеза РНК-инсектицидов в российских компаниях остаётся существенно выше мировых аналогов. По данным открытых источников, цена на заказное производство РНК-конструкций для исследований колеблется в диапазоне 3000–5000 рублей за 1 мг (Таблица 7), что связано с ограниченным количеством профильных производственных мощностей и зависимостью от импорта реактивов.

Таблица 7 – Стоимость синтеза РНК-олигонуклеотидов при покупке у научно-производственной компании «СИНТОЛ» (<https://www.syntol.ru/>)

Количество очищенного нуклеотида, ОЕ*	Формат	Дополнительная очистка	Цена за шаг (нт), руб.
5	Лиофилизированные/ растворенные в деионизированой воде (milliQ H ₂ O)	Без очистки	319
10			528
20			791
50			1571
100			2620
200			4322
500			9358
1000			16858

Примечание: *ОЕ – оптические единицы

4.2.2 Олигонуклеотидные инсектициды

В современной биотехнологической практике для разработки инновационных инсектицидных препаратов активно применяются фосфорамидитные методы твердофазного и жидкофазного синтеза олигонуклеотидов, что демонстрирует значительный потенциал в контексте

создания новых средств защиты растений (Oberemok et al., 2024b). При этом важно отметить, что стоимость синтеза олигонуклеотидов в российских компаниях является существенным фактором, влияющим на экономическую эффективность подобных разработок. Как правило, цена на синтез олигонуклеотидов в России варьируется в зависимости от ряда факторов. К таким факторам относятся зависимость от импорта реагентов и оборудования, относительно небольшие объёмы производства в России, а также длина нуклеотидной последовательности и требуемая степень очистки. По данным открытых источников, цена на заказное производство ДНК-конструкций для исследований колеблется в диапазоне 500–800 рублей за 1 мг (Таблица 8).

Таблица 8 – Стоимость синтеза ДНК-олигонуклеотидов при покупке у научно-производственной компании «СИНТОЛ» (<https://www.syntol.ru/>)

Количество очищенного нуклеотида, ОЕ*	Формат	Дополнительная очистка	Цена за шаг (нт), руб.
5	Лиофилизированные/ растворенные в деонизированной воде (milliQ H ₂ O)	Без очистки	48
10			70
20			104
50			194
100			317
200			528
500			1141
1000			2056

Примечание: обозначения те же, что и в таблице 7

Интересно отметить, что в текущих отечественных рыночных условиях цена на заказной синтез 1 мг РНК-конструкций длиной 11 нт значительно превышает цену на аналогичные ДНК-конструкции (Таблица 9).

Таблица 9 – Сравнительная стоимость синтеза ДНК/РНК-олигонуклеотидов на примере олигонуклеотида длиной 11 нуклеотидов при покупке у научно-производственной компании «СИНТОЛ» (<https://www.syntol.ru/>)

Нуклеиновая кислота	Длина, нт	Количество очищенного нуклеотида, ОЕ*							
		5	10	20	50	100	200	500	1000
РНК/цена, руб.	11	3509	5808	8701	17281	28829	47542	102938	185438
ДНК/цена, руб.		528	770	1144	2134	3487	5808	12551	22616

Примечание: обозначения те же, что и в таблице 7

Данный факт делает перспективной идеей разработку инновационных олигонуклеотидных инсектицидов на основе коротких антисмысловых ДНК-фрагментов генов насекомых-вредителей (Oberemok et al., 2016; Oberemok et al., 2017; Oberemok et al., 2018a; Oberemok et al., 2022; Oberemok et al., 2024a).

В то же время жидкофазный синтез олигонуклеотидов, который также активно используется в современной биотехнологии, демонстрирует несколько иные тенденции как в России, так и в мировом масштабе. В отличие от твердофазного метода жидкофазный синтез позволяет более гибко варьировать условия синтеза и получать олигонуклеотиды с заданными характеристиками. В России развитие данной технологии находится на начальном этапе, что влияет на стоимость и доступность таких услуг.

На международном рынке один из лидеров жидкофазного синтеза Sumitomo Chemical Co., Ltd. (Токио, Япония) предлагает синтез 1 кг немодифицированных олигонуклеотидов длиной 11 нт за 25 000 долларов США. Однако на примере хвойных тлей было продемонстрировано, что КВАДб добилась существенного снижения стоимости синтеза нуклеиновых кислот за счет жидкофазного синтеза (Oberemok et al., 2024b). Так, при норме расхода 200 л на гектар при концентрации 0,1 мг/л (или 0,1 нг/мл) стоимость необходимого количества олигонуклеотидного инсектицида составит около 0,5 долларов США при

использовании жидкофазного синтеза ДНК (Oberemok et al., 2024b). Данная технология открывает новые перспективы в области биозащиты растений, поскольку значительно снижает экономические затраты на производство инсектицидных средств на основе нуклеиновых кислот. Более доступная стоимость позволяет не только снизить расходы на применение этих средств, но и значительно увеличить частоту обработок растений олигонуклеотидными инсектицидами в реальных условиях. Это открывает возможность более гибкого и эффективного использования данных препаратов в сельскохозяйственной практике, что может привести к более надёжной защите растений от вредителей.

В свою очередь при использовании неоптимизированного твердофазного синтеза ДНК стоимость синтеза необходимого количества олигонуклеотидного инсектицида на гектар составит 20 долларов США. Фактически распределение олигонуклеотидов в соотношении 20 мг/га обеспечивает наличие огромного количества молекул на каждый квадратный миллиметр гектара, около $3,6 \cdot 10^8 / \text{мм}^2$. (Oberemok et al., 2024b). Однако для большинства вредителей, с которыми эффективно борются олигонуклеотидные инсектициды из подотряда Sternorrhyncha, при норме расхода 200 л на гектар необходимая концентрация 0,05 г/л действующего вещества существенно увеличивает цену олигонуклеотидов до 250 долларов США (Oberemok et al., 2024f). Следует подчеркнуть, что рРНК является подходящей мишенью для олигонуклеотидных инсектицидов, в то время как другие клеточные РНК менее восприимчивы к антисмысловым олигонуклеотидам даже если они идеально комплементарны. Таким образом, баланс между ценой таких инновационных инсектицидов и эффективностью формул может обеспечить популярность инсектицидов на основе нуклеиновых кислот на рынке в ближайшем будущем. Уже сегодня по предварительным расчетам КВАДб может успешно контролировать от 10 до 15% всех насекомых-вредителей.

РАЗДЕЛ 5 БИОРАЗЛАГАЕМОСТЬ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ, РАЗРАБОТАННЫХ К 28S РИБОСОМАЛЬНЫМ РНК ВРЕДИТЕЛЕЙ

Положительные тенденции развития крупной, прибыльной и глобальной коммерческой агрохимической промышленности можно наблюдать в виде изобилия доступных продуктов питания на рынках и в продуктовых магазинах по всему миру. Пестициды стали инструментом «зеленой революции», необычайного роста урожайности продовольственных культур (Jasquet et al., 2022). Любой инсектицид можно оценить по его эффективности, доступности, периоду биоразлагаемости и безопасности. Биодegradация и безопасность инсектицида тесно связаны: чем инсектицид безопаснее, тем короче его период полураспада (Pathak et al., 2022). Природные соединения распадаются на простые вещества, такие как вода, углекислый газ, аммиак, уксусная кислота, фосфорная кислота и другие, которые служат предшественниками для более сложных природных соединений, и природа не замедляет их деградацию. Тем не менее, с появлением новых поколений инсектицидов негативное воздействие на нецелевые организмы снизилось, а способность к биологическому разложению возросла (Araújo et al., 2023). Однако пример неоникотиноидов, одного из более поздних классов инсектицидов, показывает, что, несмотря на прогресс, достигнутый уровень все еще недостаточен из-за их опасного воздействия на опылителей и птиц (Muth and Leonard, 2019).

Сегодня разрабатывается новое поколение средств защиты растений на основе биополимеров, КВАДб и технологии двухцепочечной РНК (Oberemok et al., 2019a; Rank and Koch, 2021; De Schutter et al., 2022; Oberemok et al., 2022; Puzanova et al., 2023; Oberemok et al., 2024a; Oberemok et al., 2024g). Особенность функций этих природных молекул в клетке, прежде всего, подчеркивает исключительную избирательность действия таких соединений, которая зависит от комбинации азотистых оснований. Молекулы дцРНК, как и оцДНК, очень быстро биоразлагаются повсеместно

распространенными нуклеазами в экосистемах (Yang, 2011) и не требуют дополнительных условий. Минималистичная формула, содержащая только воду и целевую последовательность нуклеиновых кислот, немодифицированную антисмысловую ДНК или дцРНК, будет иметь минимальное негативное воздействие на окружающую среду из-за нуклеаз. Однако по сравнению с антисмысловой оцДНК длинные и хрупкие дцРНК более непредсказуемы и сложны, поэтому их нелегко использовать в качестве селективного и эффективного практического инструмента для защиты растений. Помимо лучшей целевой специфичности, антисмысловые олигонуклеотиды легче и дешевле синтезировать, чем миРНК или дцРНК, и в клетках человека было показано, что антисмысловые олигонуклеотиды обладают более низкой иммунореактивностью, что также имеет важное значение для потенциального применения в съедобных растениях, которые могли бы накапливать такого рода средства борьбы с насекомыми-вредителями. Важно отметить, что с точки зрения экологических рисков в многочисленных клинических исследованиях на людях нет никаких результатов, которые бы доказывали, например, события геномной интеграции, приписываемые использованию антисмысловых олигонуклеотидов (Gruber et al., 2023). Очевидно, что дополнительные вещества могут повысить эффективность инсектицидов на основе нуклеиновых кислот в отношении устойчивых видов, но также могут представлять дополнительные экологические риски.

5.1 Биоразлагаемость олигонуклеотидных инсектицидов с участием тканевых дезоксирибонуклеаз

В недавних научно-исследовательских работах было показано, что дезоксирибонуклеазы, присутствующие в клетках непарного шелкопряда (*L. dispar*), колорадского жука (*L. decemlineata*) и их растений-хозяев (*Q. pubescens* Wild., *S. tuberosum* L.), обладают высоким потенциалом биodeградируемости олигонуклеотидных инсектицидов и обеспечивают их

деградацию при взаимодействии с ними (Oberemok et al., 2018b; Oberemok et al., 2019a; Oberemok et al., 2024d). Также в ходе работы важно было оценить активность внутриклеточных дезоксирибонуклеаз в гомогенатах тканей британской щитовки, лаврой щитовки, японской восковой ложнощитовки и австралийского желобчатого червеца, а также лавра благородного, падуба остролистного и смолосемянника обыкновенного – основных растений-хозяев для исследованных насекомых-вредителей в Крыму.

Таким образом, исследования показали высокое прогрессирующее снижение концентрации олигонуклеотидных инсектицидов под действием дезоксирибонуклеаз: британской щитовки, лавровой щитовки (Рисунок 22) и лавра благородного (Рисунок 23); японской восковой ложнощитовки и падуба остролистного (Рисунок 24); австралийского желобчатого червеца и смолосемянника обыкновенного (Рисунок 25). ДНК-фрагменты полностью деградировали за 24 часа, что свидетельствует о возможности быстрой биодеградации олигонуклеотидных инсектицидов в экосистеме (Gal'chinsky et al., 2023a; Gal'chinsky et al., 2024a).

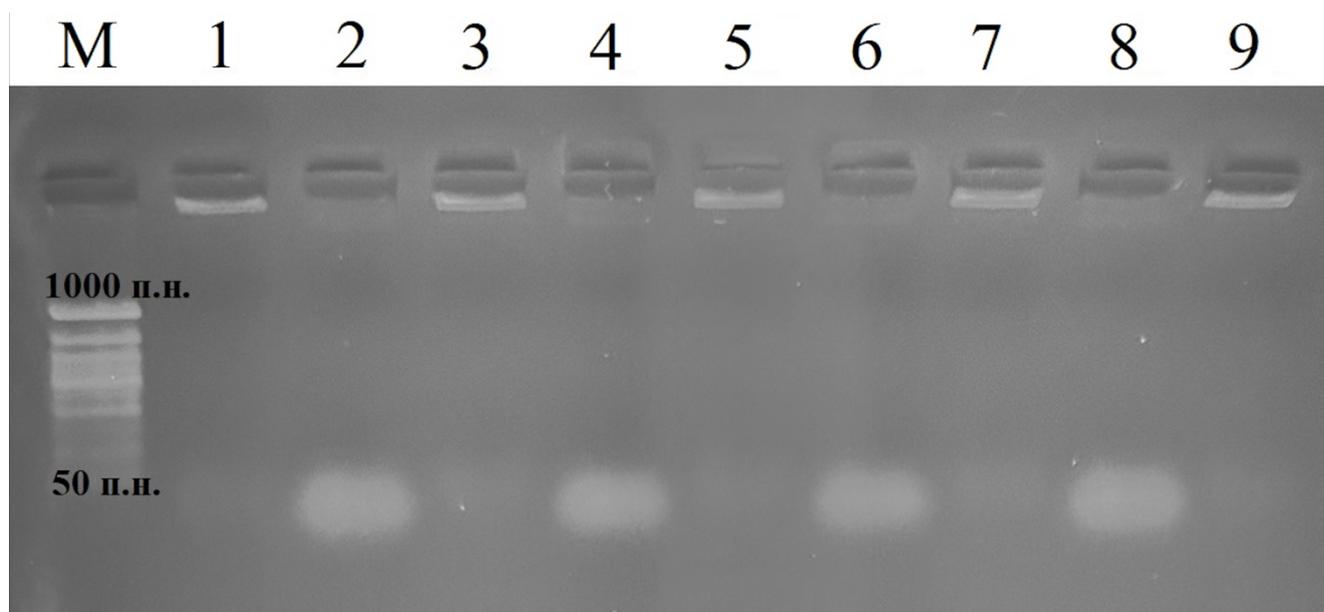


Рисунок 22 – Электрофореграмма (агарозный гель, 1,8%-ный), представляющая активность внутриклеточных дезоксирибонуклеаз британской щитовки и лавровой щитовки после 24 часов инкубации при 27°C: М – маркер молекулярных весов ДНК (с шагом в 50 п.н.); 1 – гомогенат чистой ткани насекомых (1,5 мг биомассы на 10 мкл деионизированной воды); 2 – контроль (10 мкл ЛАУРИ–11 в концентрации 100 нг/мкл); 3 – гомогенат ткани насекомых (1,5 мг биомассы на 10 мкл деионизированной воды) + 10 мкл ЛАУРИ–11 в концентрации 100 нг/мкл; 4 – контроль (10 мкл БРИТ–11 в концентрации 100 нг/мкл); 5 – гомогенат тканей насекомых (1,5 мг биомассы на 10 мкл деионизированной воды) + 10 мкл БРИТ–11 в концентрации 100 нг/мкл; 6 – контроль (10 мкл БРИТ(5')–11 в концентрации 100 нг/мкл); 7 – гомогенат тканей насекомых (1,5 мг биомассы на 10 мкл деионизированной воды) + 10 мкл БРИТ(5')–11 в концентрации 100 нг/мкл; 8 – контроль (10 мкл БРИТ(3')–11 в концентрации 100 нг/мкл); 9 – гомогенат тканей насекомых (1,5 мг биомассы на 10 мкл деионизированной воды) + 10 мкл БРИТ(3')–11 в концентрации 100 нг/мкл

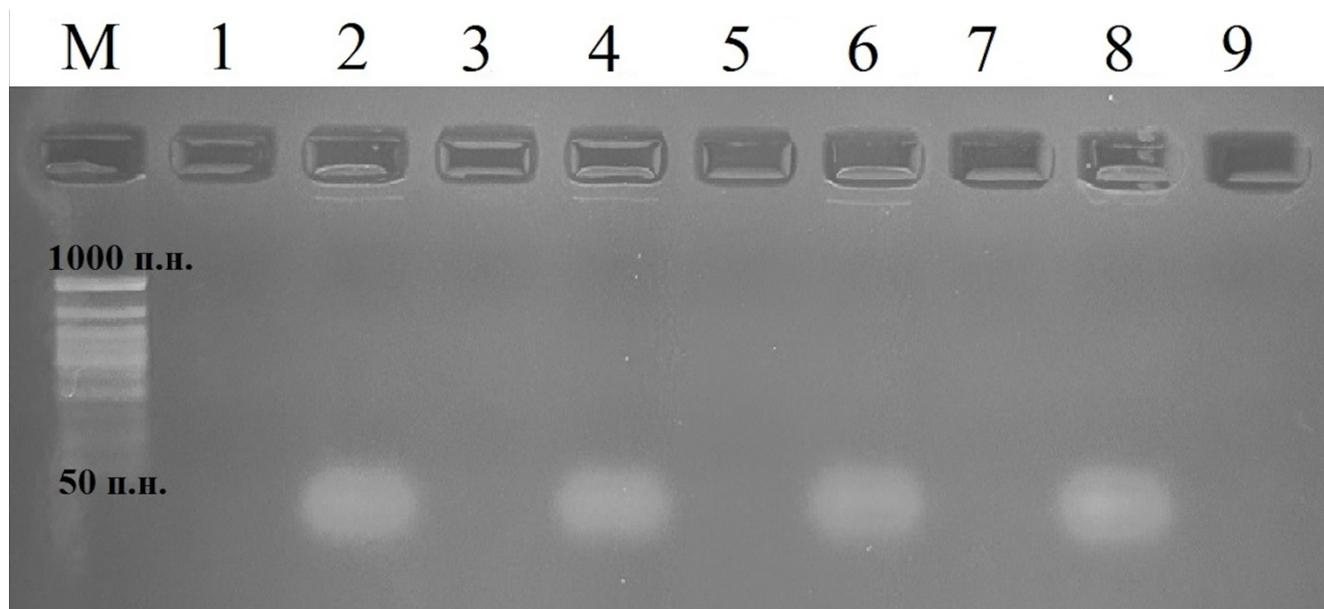


Рисунок 23 – Электрофореграмма (агарозный гель, 1,8%-ный), представляющая активность внутриклеточных дезоксирибонуклеаз лавра благородного после 24 часов инкубации при 27°C: М – маркер молекулярных весов ДНК (с шагом в 50 п.н.); 1 – гомогенат чистой ткани листьев (1,5 мг биомассы на 10 мкл деионизированной воды); 2 – контроль (10 мкл ЛАУРИ–11 в концентрации 100 нг/мкл); 3 – гомогенат ткани листьев (1,5 мг биомассы на 10 мкл деионизированной воды) + 10 мкл ЛАУРИ–11 в концентрации 100 нг/мкл; 4 – контроль (10 мкл БРИТ–11 в концентрации 100 нг/мкл); 5 – гомогенат ткани листьев (1,5 мг биомассы на 10 мкл деионизированной воды) + 10 мкл БРИТ–11 в концентрации 100 нг/мкл; 6 – контроль (10 мкл БРИТ(5')–11 в концентрации 100 нг/мкл); 7 – гомогенат ткани листьев (1,5 мг биомассы на 10 мкл деионизированной воды) + 10 мкл БРИТ(5')–11 в концентрации 100 нг/мкл; 8 – контроль (10 мкл БРИТ(3')–11 в концентрации 100 нг/мкл); 9 – гомогенат ткани листьев (1,5 мг биомассы на 10 мкл деионизированной воды) + 10 мкл БРИТ(3')–11 в концентрации 100 нг/мкл

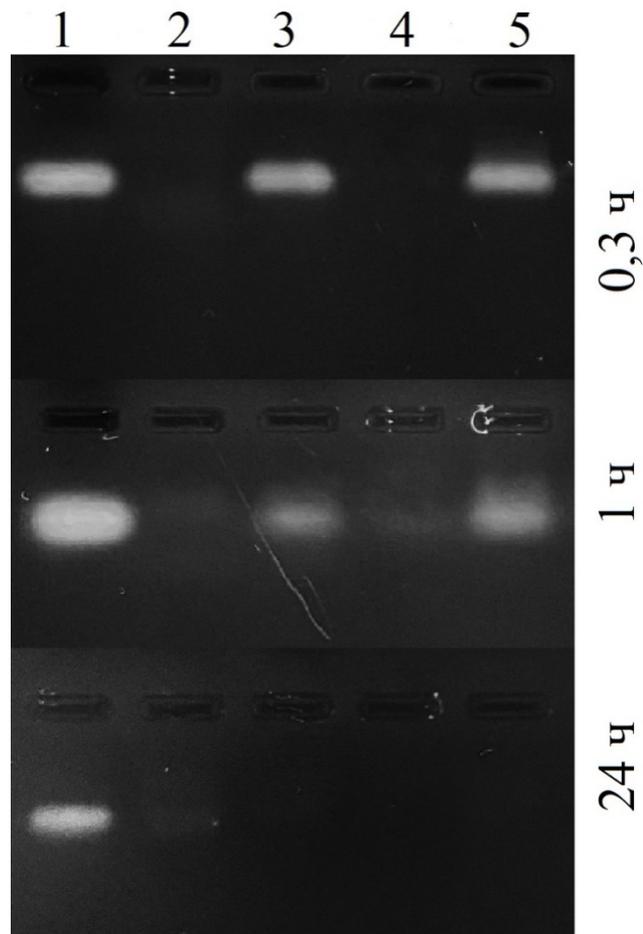


Рисунок 24 – Электрофореграмма (агарозный гель, 1,8%-ный), представляющая активность внутриклеточных дезоксирибонуклеаз японской восковой ложнощитовки и падуба остролистного после 0,3, 1 и 24 часов инкубации при 27°C: 1 – контроль (10 мкл ЯВОЛ-11-фрагмента в концентрации 100 нг/мкл); 2 – гомогенат чистой ткани японской восковой ложнощитовки (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды); 3 – гомогенат ткани японской восковой ложнощитовки (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды) + 10 мкл ЯВОЛ-11-фрагмента в концентрации 100 нг/мкл; 4 – гомогенат чистой ткани падуба остролистного (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды); 5 – гомогенат ткани падуба остролистного (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды) + 10 мкл ЯВОЛ-11-фрагмента в концентрации 100 нг/мкл

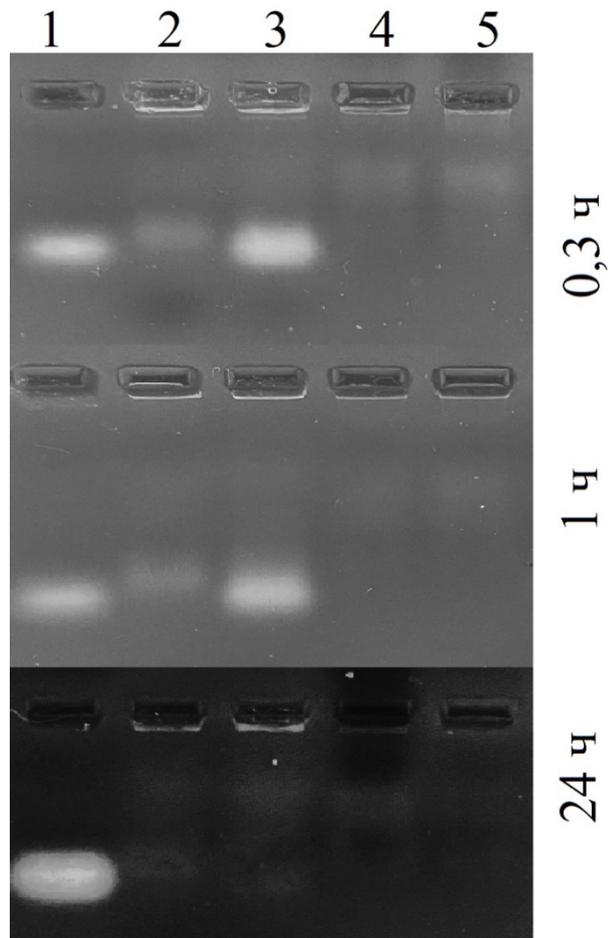


Рисунок 25 – Электрофореграмма (агарозный гель, 1,8%-ный), представляющая активность внутриклеточных дезоксирибонуклеаз австралийского желобчатого червеца и смолосемянника обыкновенного после 0,3, 1 и 24 часов инкубации при 27°C: 1– контроль (10 мкл АВЖЕЧ-11-фрагмента в концентрации 100 нг/мкл); 2 – гомогенат чистой ткани австралийского желобчатого червеца (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды); 3 – гомогенат ткани австралийского желобчатого червеца (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды) + 10 мкл АВЖЕЧ-11-фрагмента в концентрации 100 нг/мкл; 4 – гомогенат чистой ткани смолосемянника обыкновенного (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды); 5 – гомогенат ткани смолосемянника обыкновенного (1,5 мг биомассы на 10 мкл дистиллированной воды) + 10 мкл АВЖЕЧ-11-фрагмента в концентрации 100 нг/мкл

Преимущество использования природных олигомеров, немодифицированных антисмысловых олигонуклеотидов представляется наиболее безопасным способом, поскольку клетки всех живых организмов содержат повсеместно встречающиеся нуклеазы, способные их нейтрализовать (Oberemok et al., 2019a; Oberemok et al., 2024d; Gal'chinsky et al., 2024c). Следовательно, для олигонуклеотидных инсектицидов нет необходимости искать методы ускоренной биodeградации. Принцип использования олигонуклеотидных инсектицидов заключается в том, что они должны иметь достаточно времени для действия в нужном месте и на нужный организм до их быстрой биodeградации. Напротив, обычные химические инсектициды имеют слишком много времени для своего действия не только в нужном месте и не только на нужный организм. Таким образом, при использовании немодифицированных антисмысловых фрагментов ДНК в клетках насекомых, преимущественно между экзонуклеазами и нуклеазами, управляемыми нуклеиновыми кислотами, будет возникать конкуренция между разными типами нуклеаз за субстрат (Oberemok et al., 2024c).

Подводя итог данной работы, следует отметить, что в сельском хозяйстве все компоненты экосистем – продуценты, консументы и редуценты – важно учитывать, так как они тесно взаимосвязаны. Использование химических инсектицидов, несмотря на их эффективность, сопряжено с рисками. Эти вещества могут накапливаться в почве, проникать в грунтовые воды и становиться более токсичными по мере перемещения по трофическим цепям. Это приводит к загрязнению окружающей среды и угрожает здоровью экосистем.

Для устойчивого развития сельского хозяйства необходимо искать альтернативные методы борьбы с вредителями. Одним из перспективных направлений является использование природных молекул, таких как нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК). Эти вещества способны избирательно воздействовать на метаболические процессы в клетках насекомых-вредителей, не нанося вреда окружающей среде. Антисмысловые фрагменты ДНК, разработанные специально для борьбы с насекомыми-вредителями, могут стать основой «зелёных» инсектицидов. Они позволяют эффективно контролировать численность

вредителей, минимизируя воздействие на экосистему. Такой подход не только способствует сохранению биоразнообразия, но и обеспечивает безопасность продуктов питания.

Таким образом, переход на биотехнологические методы борьбы с вредителями является ключевым шагом к устойчивому развитию сельского хозяйства. Это позволяет сохранить плодородие почвы, защитить водные ресурсы и обеспечить экологическую безопасность продукции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Олигонуклеотидные инсектициды как макромолекулы природного происхождения не будут накапливаться в природе и способны обеспечить избирательность действия за счёт уникальных комбинаций азотистых оснований. Проведенные многолетние исследования в период с 2020 по 2022 годы на насекомых-вредителях из подотряда грудохоботных показали, что олигонуклеотидные инсектициды обладают высокой биологической эффективностью, способны вызывать высокую смертность целевых насекомых-вредителей путём нарушения экспрессии пре-рРНК и рРНК, а также могут стать новым классом препаратов в защите растений после их регистрации.

1. Контактное применение олигонуклеотидных инсектицидов на листьях растений (1 мг/м²), содержащих насекомых-вредителей (лавровая щитовка, британская щитовка, мягкая ложнощитовка, японская восковая ложнощитовка, австралийский желобчатый червец, лавровая листоблошка), обеспечивает биологическую эффективность со средним показателем $81,81 \pm 12,57\%$ в течение 10-14 суток ($p < 0,01$) и демонстрирует избирательный контроль в сложных природных экосистемах.

2. Замена азотистого основания в последовательности олигонуклеотидного инсектицида БРИТ-11 на 5'-конце приводила к снижению его эффективности на 17%, а на 3'-конце – на 45%. Замена азотистого основания в 6-й позиции снижала эффективность на 37%. На личинках лавровой щитовки и британской щитовки было показано, что комплементарность 3'-концевого нуклеотида к целевой 28S рРНК наиболее важна для выраженного инсектицидного эффекта. Обнаруженная значимость нуклеотидов для инсектицидного эффекта составила: $5' < (6) < 3'$.

3. На личинках лавровой щитовки, британской щитовки, мягкой ложнощитовки, японской восковой ложнощитовки, австралийского желобчатого червца и лавровой листоблошки методом анализа концентрации целевых рРНК хозяина показано, что основным специфическим механизмом, обуславливающим гибель клеток насекомых, является механизм ДНК-сдерживания. Данный

механизм состоит из двух этапов (первый этап – остановка функции рРНК, приводящая к гиперкомпенсации рРНК; второй этап – ферментативное расщепление рРНК с помощью ДНК-направляемой РНКазы H, происходящее благодаря действию олигонуклеотидных инсектицидов ЛАУРИ-11, БРИТ-11, КОККУС-11, ЯВОЛ-11, АВЖЕЧ-11 и АЛАКРИС-11.

4. Разработанные против *A. lauri*, *D. britannicus*, *C. japonicus*, *I. purchasi* олигонуклеотидные инсектициды (ЛАУРИ-11-фрагмент, БРИТ-11-фрагмент, ЯВОЛ-11-фрагмент, АВЖЕЧ-11-фрагмент) обладают высокой скоростью биоразложения: в гомогенатах тканей насекомых и растений полностью деградировали за 24 часа.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основании проведённых исследований, представленных в диссертационной работе, был сформирован ряд практических рекомендаций по использованию олигонуклеотидных инсектицидов в сельском хозяйстве. Программа DNAINsector (dnainsector.com) или ручной подбор последовательностей пре-рРНК и рРНК вредителей из базы данных GenBank позволяют разработать олигонуклеотидные инсектициды.

Для эффективного применения олигонуклеотидных инсектицидов в сельском хозяйстве следует придерживаться определённых правил. Важно учитывать погодные условия: отсутствие осадков и температуру воздуха. Рекомендуемый диапазон температур – от 18 до 25°C. Оптимальное время обработки – с 7 до 10 часов утра, а также с 18 до 20 часов вечера. Рекомендуемая норма расхода препарата на гектар – 10 граммов/200 литров. Срок хранения в водном растворе составляет до 10 дней при 25°C, в лиофилизированном состоянии при -20 до -80°C – практически неограниченное время. Рабочий раствор рекомендуется готовить строго перед началом обработки. Для обработки рекомендуется использовать различные опрыскивающие установки, которые образуют размер капли до 15 ± 5 мкм и равномерно ее распределяют на обрабатываемой поверхности. Тем не менее в зависимости от типа обрабатываемой территории, растений, а также местоположения насекомых-вредителей на данных растениях расход препарата можно увеличить, по усмотрению оператора, проводящего обработку. При необходимости количество обработок можно увеличить до 3-х с однодневным интервалом. Оператор при работе с олигонуклеотидными инсектицидами должен соблюдать ГОСТ 12.3.041–86, так как безопасность работы с данными препаратами все еще изучается. Олигонуклеотидные пестициды также совместимы с применением вирусных (Oberemok et al., 2017) и грибковых (Gavrilova et al., 2025) биопестицидов. Такие формуляции демонстрируют более высокую смертность вредителей (Oberemok et al., 2017; Gavrilova et al., 2025).

Фосфорамидитный твердофазный метод с применением синтезатора ДНК/РНК ASM-800ЕТ (БИОССЕТ, Новосибирск, Россия) подходит для синтеза олигонуклеотидных пестицидов. Также можно осуществлять синтез олигонуклеотидов и на таких синтезаторах, как Ну-12 и Ну-14 (Hunan Nonyu Biotech Co., Ltd., Циндао, Китай). Качество полученного продукта рекомендуется проверять методом времяпролётной масс-спектрометрии и горизонтального электрофореза. Перед применением олигонуклеотидных инсектицидов необходимо учитывать погодные условия, соблюдать правила безопасности и начинать мероприятия по защите растений только при соответствии всем указанным требованиям.

Следует отметить, что важнейшей предварительной рекомендацией является способ расчёта безопасности конкретного олигонуклеотидного пестицида в агроэкосистеме для ряда нецелевых организмов. Для этого необходимо:

1. Выбрать целевую область рРНК (например, фрагмент длиной 500 нт из 28S рРНК) вредителя, а также соответствующие области у нецелевых организмов.
2. Установить последовательность целевой рРНК (в нашем случае — фрагмент длиной 500 нт из 28S рРНК) всех беспозвоночных данной агроэкосистемы — это требует проведения секвенирования ДНК. При этом другие животные и растения не будут чувствительны к технологии «генетической застёжки-молнии» из-за их физиологических барьеров.
3. Выполнить выравнивание целевых фрагментов 28S рРНК длиной 500 нт у всех беспозвоночных данной агроэкосистемы.
4. Выбрать наиболее отличающуюся часть последовательности, принадлежащую насекомому-вредителю (это может быть последовательность длиной около 100 нт из фрагмента 28S рРНК длиной 500 нт).
5. Загрузить выбранную последовательность в веб-инструмент DNAInsector.
6. Сгенерировать уникальный олигонуклеотидный пестицид длиной 11 нт.

7. Ещё раз проверить (при необходимости можно вручную скорректировать), чтобы пестицид не был комплементарен другим участкам целевого фрагмента 28S рРНК (длиной 500 нт) у нецелевых беспозвоночных.

Математически с высокой вероятностью (> 99 %) такой олигонуклеотидный пестицид также не будет комплементарен другим рРНК нецелевых беспозвоночных в данной экосистеме. Поэтому полной информации по последовательности всей рРНК, включающей 5S, 5,8S, 12S, 16S, 18S, 28S, ETS (внешний транскрибируемый спейсер) и ITS (внутренний транскрибируемый спейсер), которая составляет около 10 000 нт у каждого нецелевого беспозвоночного, не требуется. Данный алгоритм существенно упрощает отбор эффективных и селективных олигонуклеотидных пестицидов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Перспективным направлением продолжения исследований является разработка способов расширения арсенала олигонуклеотидных инсектицидов и снижения их себестоимости с целью получения высокоизбирательных препаратов нового поколения для защиты сельскохозяйственных культур от насекомых-вредителей. На основе анализа полученных данных можно предположить, что олигонуклеотидные инсектициды будут наиболее эффективны против серьезного сельскохозяйственного насекомого-вредителя кормовой свёклы *Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var. *Crassa* (Caryophyllales: Amaranthaceae) – тутовой щитовки (*Pseudaulacaspis pentagona* Targioni-Tozzetti (Hemiptera: Sternorrhyncha).

На практике внедрение метода «генетической застёжки-молнии» на основе КВАДб в методы защиты растений поможет создать гибкую систему адаптации олигонуклеотидных инсектицидов к постоянно меняющейся генетике вредителей в ходе микроэволюции. Основная цель коротких олигонуклеотидных инсектицидов – здоровые культуры без потери урожайности – помогает легко адаптироваться к микроэволюции вредителей и, по последним прогнозам, доступность подхода делает его весьма перспективным для внедрения в сельское хозяйство в больших масштабах. Однако химические инсектициды все еще остаются основными препаратами для борьбы с насекомыми-вредителями (Sparks et al., 2021; Araújo et al., 2023; Barathi et al., 2024; Lazarević-Pašti et al., 2025).

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

12S рРНК – 12S рибосомальная РНК

16S рРНК – 16S рибосомальная РНК

18S рРНК – 18S рибосомальная РНК

28S рРНК – 28S рибосомальная РНК

5,8S рРНК – 5,8S рибосомальная РНК

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНКс – ДНК-сдерживание

дц – двухцепочечный

КВАДб – контактно вводимая антисмысловая ДНК-биотехнология

кДНК – комплементарная ДНК

мРНК – матричная РНК

нт – нуклеотид

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

оц – одноцепочечный

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

рН – водородный показатель

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНКи – РНК-интерференция

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

df – степень свободы

N – объем выборки

p – уровень значимости

χ^2 – тест на гомогенность частот между выборками контрольных и опытных вариантов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 5X qPCRMix-HS SYBR. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://evrogen.ru/kit-user-manuals/qPCRMix-HS-SYBR_PK147.pdf (дата обращения: 02.08.2025). – Текст электронный.
2. Андреева О. А. Перспективы использования ДНК-инсектицида Eriola-11 для контроля численности кровяной тли *Eriosoma lanigerum* Hausmann, 1802 / О. А. Андреева, А. П. Дмитриенко, Т. С. Рыбарева, А. К. Шармагий, В. В. Оберемок // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2024. – № 153. – С. 43-52.
3. Гальчинский Н. В. Эффективность применения инновационного олигонуклеотидного инсектицида КОККУС-11 в борьбе с *Coccus hesperidum* L. в условиях ФГБУН «НБС-ННЦ» РАН / Н. В. Гальчинский // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2025а. – № 157. – С. 132-141.
4. Гальчинский, Н. В. Контроль австралийского желобчатого червеца (*Icerya purchasi* Maskell) при помощи инновационного олигонуклеотидного инсектицида Авжеч-11 / Н. В. Гальчинский, Р. Ж. Усеинов, И. А. Новиков, В. В. Оберемок // Экосистемы. – 2023. – № 33. – С. 32-37.
5. Гальчинский, Н. В. Оценка эффективности и безопасности применения олигонуклеотидных инсектицидов / Н. В. Гальчинский // Инновационные технологии и технические средства для АПК: материалы международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов (07-08 октября 2025 г.). – Воронеж: ФГБОУ ВО Воронежский ГАУ, 2025б. – С. 215-220.
6. Долгих В. Первая оценка генов репликации ДНК генома *Vairimorpha* (Nosema) seranae как мишеней для подавления ноземоза медоносной пчелы *Apis mellifera* с помощью РНК-интерференции / В. Долгих, А. Игнатьева, А. Румянцева, С. Тимофеев, Р. Р. Фадеев, К-Д. К. Байазыт // Protistology. – 2025. – Вып. 19, № 1. – С. 3-14.

7. Журавлев В. С. Метод РНК-интерференции в защите растений от насекомых-вредителей / В. С. Журавлев, В. В. Долгих, С. А. Тимофеев, Ф. Б. Ганнибал // Вестник защиты растений (Plant Protection News). – 2022. – Вып. 105, № 1. – С. 28-39.

8. Конарев А. В. РНК-интерференция в изучении функций генов у тлей и других полужесткокрылых и борьбе с их вредными представителями / А. В. Конарев // Вестник защиты растений (Plant Protection News). – 2023. – Вып. 106, № 1. – С. 26-48.

9. Насухова Н. М. Биологически активные вещества листьев лавра благородного / Н. М. Насухова, Л. А. Логвиненко, А. Л. Харченко, Д. А. Коновалов // Фармация и фармакология. – 2017. – Вып. 5, № 3. – С. 200-221.

10. Ниадар П. М. ДНК-инсектициды как новое направление в защите растений и обеспечении продовольственной безопасности / П. М. Ниадар, Ш. Разо // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. – 2019. – Том 14, №2. – С. 105-113.

11. Новиков И. А. Первый опыт применения олигонуклеотидных инсектицидов для контроля численности калинового мучнистого червеца *Pseudococcus viburni* / И. А. Новиков, Е. В. Яцкова, Е. В. Пузанова, А. И. Билык, А. К. Шармагий, В. В. Оберемок // Экосистемы. – 2022. – Вып. 32. – С. 85-89.

12. Патент № 2743394 С1 Российская Федерация, МПК С12N 7/00 (2006.01). Способ борьбы с насекомыми-вредителями из надсемейства кокцидовых (Coccoidea): № 2020113394: заявл. 30.03.2020: опубл. 18.02.2021 / Оберемок В. В., Лайкова Е. В., Гальчинский Н. В., Новиков И. А., Усеинов Р. Ж.; заявители Оберемок В. В., Лайкова Е. В., Гальчинский Н. В., Новиков И. А., Усеинов Р. Ж. – 8 с.

13. Патент №36445 Україна, МПК (2006) А01М 1/20. Засіб знищення листогризучих комах з ряду лускокрилих: опубл. 27.10.2008. Бюл. № 20 / Оберемок В. В.

14. Плугатарь Ю. В. Инновационный способ контроля численности *Diaspis echinocacti* Vouche при помощи ДНК-инсектицида на *Opuntia*

ficus-indica (L.) Mill. в Никитском ботаническом саду / Ю. В. Плугатарь, Е. С. Чичканова, Е. В. Яцкова, А. К. Шармагий, В. В. Оберемок // Юг России: экология, развитие. – 2021. – Том 16, № 2 – С. 119-128.

15. Плугатарь Ю.В. Применение олигонуклеотидных инсектицидов для контроля смешанных популяций насекомых-вредителей семейства Diaspididae / Ю.В. Плугатарь, Н.В. Гальчинский, Е.В. Яцкова, А.К. Шармагий, В.В. Оберемок // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2025б. – № 154. – С. 95-104.

16. Плугатарь Ю.В. Разработка и применение инновационного олигонуклеотидного инсектицида ЯВОЛ-11 для контроля *Ceroplastes japonicus* Green (подотряд Sternorrhyncha) / Ю.В. Плугатарь, Н.В. Гальчинский, Е.В. Яцкова, А.К. Шармагий, В.В. Оберемок // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2025а. – № 156. – С. 7-17.

17. Распоряжение Правительства РФ от 04.07.2023 N 1788-р (ред. от 08.05.2025) <Об утверждении Стратегии развития производства органической продукции в Российской Федерации до 2030 года> [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_452275/ (дата обращения: 14.09.2025). – Текст электронный.

18. Трикоз Н. Н. Основные вредители лавра благородного (*Laurus nobilis* L.) В парках Крыма и меры борьбы с ними / Н. Н. Трикоз // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2017. – № 124. – С. 116-122.

19. Ahmad S. Double-stranded RNA degrading nuclease affects RNAi efficiency in the melon fly, *Zeugodacus cucurbitae* / S. Ahmad, M. Jamil, C.C. Jaworski, Y. Luo // Journal of Pest Science. – 2024. – Vol. 97. – P. 397-409.

20. Ak K. Biological control of *Icerya purchasi* Maskell (Hemiptera: Margarodidae) with *Rodolia cardinalis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) in a Cherry Laurel Orchard / K. Ak, I. Akça, I. Saruhan // International Journal of Agriculture Innovations and Research. – 2017. – Vol. 5. – P. 1077-1080.

21. Alengebawy A. Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications / A. Alengebawy, S. T. Abdelkhalek, S. R. Qureshi, M.Q. Wang // *Toxics*. – 2021. – Vol. 9, № 3. – P. 42.
22. Allan E. A. Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes / E. A. Allan, W. G. Zhang, A. C. Lavery, A. F. Govindarajan // *Environmental DNA*. – 2020. – Vol. 3. – P. 492-514.
23. Almeida G. R. Nucleases as a barrier to gene silencing in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* / G. R. Almeida, L. Lima Pepino Macedo, D. Cabral do Nascimento, F. X. Gillet, C. E. Moreira-Pinto, M. Faheem, A. M. Moreschi Basso, M. C. Mattar Silva, M. F. Grossi-de-Sa // *PLOS One*. – 2017. – Vol. 12, № 12. – P. e0189600.
24. Araújo M. F. The buzz on insecticides: a review of uses, molecular structures, targets, adverse effects, and alternatives / M. F. Araújo, E. M. S. Castanheira, S. F. Sousa // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28, № 8. – P. 3641.
25. Araujo R. N. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection / R. N. Araujo, A. Santos, F. S. Pinto, N. F. Gontijo, M. J. Lehane, M. H. Pereira // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 36. – P. 683-693.
26. Arora A. K. Non-target effects of dsRNA molecules in Hemipteran insects / A. K. Arora, S. H. Chung, A. E. Douglas // *Genes*. – 2021. – Vol. 12, № 3. – P. 407.
27. Arpaia S. Biosafety of GM crop plants expressing dsRNA: data requirements and EU regulatory considerations / S. Arpaia, O. Christiaens, K. Giddings, H. Jones, B. Mezzetti, F. Moronta Barrios, J. N. Perry, J. B. Sweet, C. N. T. Taning, G. Smaghe, A. Dietz-Pfeilstetter // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – Vol. 11. – P. 940.
28. Bachman P. Environmental fate and dissipation of applied dsRNA in soil, aquatic systems, and plants / P. Bachman, J. Fischer, Z. Song, E. Urbanczyk-Wochniak, G. Watson // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – Vol. 11. – P. 21.
29. Bachman P. M. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) / P. M. Bachman, R. Bolognesi, W. J. Moar,

G. M. Mueller, M. S. Paradise, P. Ramaseshadri, J. Tan, J. P. Ufman, J. Warren, B. E. Wiggins, S. L. Levine // *Transgenic Research*. – 2013. – Vol. 22. – P. 1207-1222.

30. Balabanidou V. Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance / V. Balabanidou, L. Grigoraki, J. Vontas // *Current Opinion in Insect Science*. – 2018. – Vol. 27. – P. 68-74.

31. Barathi S. Present status of insecticide impacts and eco-friendly approaches for remediation-a review / S. Barathi, N. Sabapathi, S. Kandasamy, J. Lee // *Environmental Research*. – 2024. – Vol. 240. – P. 117432.

32. Barnes M. A. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics / M. A. Barnes, C. R. Turner // *Conservation Genetics*. – 2016. – Vol. 17. – P. 1-17.

33. Bauer-Pankus A. Risk assessment of genetically engineered plants that can persist and propagate in the environment / A. Bauer-Pankus, J. Miyazaki, K. Kawall, C. Then // *Environmental Sciences Europe*. – 2020. – Vol. 32, № 32. – P. 1-15.

34. Bello E. Staying dry and clean: an insect's guide to hydrophobicity / E. Bello, Y. Chen, M. Alleyne // *Insects*. – 2022. – Vol. 14, № 1. – P. 42.

35. Belluco S. Insects and public health: an overview / S. Belluco, M. Bertola, F. Montarsi, G. Di Martino, A. Granato, R. Stella, M. Martinello, F. Bordin, F. Mutinelli // *Insects*. – 2023. – Vol. 14, № 3. – P. 240.

36. Bøhn T. Complex outcomes from insect and weed control with transgenic plants: ecological surprises? / T. Bøhn, G. L. Lövei // *Frontiers Environmental Science*. – 2017. – Vol. 5. – P. 60.

37. Boukouvala M. C. *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Erebidae): current status of biology, ecology, and management in Europe with notes from North America / M. C. Boukouvala, N. G. Kavallieratos, A. Skourti, X. Pons, C. L. Alonso, M. Eizaguirre, E. B. Fernandez, E. D. Solera, S. Fita, T. Bohinc // *Insects*. – 2022. – Vol. 13, № 9. – P. 854.

38. Bowling R. D. Sugarcane Aphid (Hemiptera: Aphididae): A New Pest on Sorghum in North America / R. D. Bowling, M. J. Brewer, D. L. Kerns, J. Gordy, N.

Seiter, N. E. Elliott, G. D. Buntin, M. Way, T. Royer, S. Biles // *Journal of Integrated Pest Management*. – 2016. – Vol. 7, № 1. – P. 12.

39. Bradshaw C. J. A. Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects / C. J. A. Bradshaw, B. Leroy, C. Bellard, D. Roiz, C. Albert, A. Fournier, M. Barbet-Massin, J-M. Salles, F. Simard, F. Courchamp // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7. – P. 12986.

40. Brutscher L. M. Virus and dsRNA-triggered transcriptional responses reveal key components of honey bee antiviral defense / L. M. Brutscher, K. F. Daughenbaugh, M. L. Flenniken // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7, № 3. – P. 6448.

41. Bustin S. A. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis / S. A. Bustin, R. Mueller // *Clinical Science*. – 2005. – Vol. 109, № 4. – P. 365-379.

42. Cagliari D. Management of pest insects and plant diseases by non-transformative RNAi / D. Cagliari, N. P. Dias, D. M. Galdeano, E. Á. Dos Santos, G. Smaghe, M. J. Zotti // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1319.

43. Camacho-Pérez M. R. Organophosphorus Pesticides as Modulating Substances of Inflammation through the Cholinergic Pathway / M. R. Camacho-Pérez, C. E. Covantes-Rosales, G. A. Toledo-Ibarra, U. Mercado-Salgado, M. D. Ponce-Regalado, K. J. G. Díaz-Resendiz, M. I. Girón-Pérez // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – P. 4523.

44. Camp A. A. Can't take the heat: temperature enhanced toxicity in the mayfy *Isonychia bicolor* exposed to the neonicotinoid insecticide imidacloprid / A. A. Camp, D. B. Buchwalter // *Aquatic Toxicology*. – 2016. – Vol. 178. – P. 49-57.

45. Cantón P. E. Proteases and nucleases across midgut tissues of *Nezara viridula* (Hemiptera:Pentatomidae) display distinct activity profiles that are conserved through life stages / P. E. Cantón, B. C. Bonning // *Journal of Insect Physiology*. – 2019. – Vol. 119. – P. 103965.

46. Cappelle K. The involvement of clathrin-mediated endocytosis and two Sid-1-like transmembrane proteins in double-stranded RNA uptake in the colorado

potato beetle midgut / K. Cappelle, C. F. de Oliveira, B. Van Eynde, O. Christiaens, G. Smagghe // *Insect Molecular Biology*. – 2016. – Vol. 25. – P. 315-323.

47. Casida J. E. Neonicotinoids and other insect nicotinic receptor competitive modulators: progress and prospects / J. E. Casida // *Annual Review of Entomology*. – 2018. – Vol. 63. – P. 125-144.

48. Castellanos N. L. Risk assessment of RNAi-based pesticides to non-target organisms: evaluating the effects of sequence similarity in the parasitoid wasp *Telenomus podisi* / N. L. Castellanos, G. Smagghe, C. N. T. Taning, E. E. Oliveira, O. Christiaens // *Science of the Total Environment*. – 2022. – Vol. 832. – P. 154746.

49. Cech R. Pesticide use and associated greenhouse gas emissions in sugar beet, apples, and viticulture in Austria from 2000 to 2019 / R. Cech, F. Leisch, J. G. Zaller // *Agriculture*. – 2022. – Vol. 12, № 6. – P. 879.

50. Cedden D. Effective target genes for RNA interference-based management of the cabbage stem flea beetle / D. Cedden D, G. Güney, X. Debaisieux, S. Scholten, M. Rostás, G. Bucher // *Insect Molecular Biology*. – 2025. – Vol. 34, № 4. – P. 527-539.

51. Chen J. Off-target effects of RNAi correlate with the mismatch rate between dsRNA and non-target mRNA / J. Chen, Y. Peng, H. Zhang, K. Wang, C. Zhao, G. Zhu, S. Reddy Palli, Z. Han // *RNA Biology* – 2021. – Vol. 18. – P. 1747-1759.

52. Chen S. Microbial detoxification of bifenthrin by a novel yeast and its potential for contaminated soils treatment / S. Chen, J. Luo, M. Hu, P. Geng, Y. Zhang // *PLOS One*. – 2012. – Vol. 7. – P. e30862.

53. Chen Y. Biosafety aspects of RNAi-based pests' control / Y. Chen, K. De Schutter // *Pest Management Science*. – 2024. – Vol. 80, № 8. – P. 3697-3706.

54. Chiba A. *Staphylococcus aureus* utilizes environmental RNA as a building material in specific polysaccharide-dependent biofilms / A. Chiba, M. Seki, Y. Suzuki, Y. Kinjo, Y. Mizunoe, S. Sugimoto // *NPJ Biofilms Microbiomes*. – 2022. – Vol. 8, № 17. – P. 1-10.

55. Christiaens O. Double stranded RNA technology to control insect pests: current status and challenges / O. Christiaens, S. Whyard, A.M. Vélez, G. Smagghe // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – Vol. 11. – P. 451.
56. Christiaens O. DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay / O. Christiaens, L. Swevers, G. Smagghe // *Peptides*. – 2014. – Vol. 53. – P. 307-314.
57. Christiaens O. Increased RNAi efficacy in *Spodoptera exigua* via the formulation of dsRNA with guanylated polymers / O. Christiaens, M. G. Tardajos, Z. L. Martinez Reyna, M. Dash, P. Dubruel, G. Smagghe // *Frontiers in Physiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 316.
58. Cohen J. E. A food web approach to evaluating the effect of insecticide spraying on insect pest population dynamics in a Philippine irrigated rice ecosystem / J. E. Cohen, K. Schoenly, K. L. Heong, H. Justo, G. Arida, A. T. Barrion, J. A. Litsinger // *Journal of Applied Ecology*. – 1994. – Vol. 31. – P. 747-763.
59. Cooper A. M. Comparison of strategies for enhancing RNA interference efficiency in *Ostrinia nubilalis* / A. M. Cooper, H. Song, Z. Yu, M. Biondi, J. Bai, X. Shi, Z. Ren, S. M. Weerasekara, D. H. Hua, K. Silver, J. Zhang, K. Y. Zhu // *Pest Management Science*. – 2021. – Vol. 77, № 2. – P. 635-645.
60. Cooper A. M. Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects / A. M. Cooper, K. Silver, J. Zhang, Y. Park, K. Y. Zhu // *Pest Management Science*. – 2019. – Vol. 75. – P. 18-28.
61. Cresswell J. On the natural history of neonicotinoids and bees / J. Cresswell // *Functional Ecology*. – 2014. – Vol. 28. – P. 1311-1312.
62. Crossley M. S. Warmer temperatures trigger insecticide associated pest outbreaks / M. S. Crossley, O. M. Smith, A. K. Barman, J. R. Croy, J. M. Schmidt, M. D. Toews, W. E. Snyder // *Pest Management Science*. – 2024. – Vol. 80, № 3. – P. 1008-1015.
63. Cunningham M.W. Pathogenesis of group A streptococcal infections / M.W. Cunningham // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2000. – Vol. 13. – P. 470-511.

64. Dalakouras A. DsRNA-based pesticides: considerations for efficiency and risk assessment / A. Dalakouras, V. Koidou, K. Papadopoulou // *Chemosphere*. – 2024. – Vol. 352. – P. 141530.
65. Dalakouras A. Epigenetic modifications: an unexplored facet of exogenous RNA application in plants / A. Dalakouras, K.K. Papadopoulou // *Plants*. – 2020. – Vol. 9, № 6. – P. 673.
66. Dalakouras A. Induction of promoter DNA methylation upon high-pressure spraying of double-stranded RNA in plants / A. Dalakouras, I. Ganopoulos // *Agronomy*. – 2021. – Vol. 11, № 4. – P. 789.
67. De Diesbach P. Identification, purification and partial characterization of an oligonucleotide receptor in membranes of HepG2 cells / P. De Diesbach, C. Berens, F. N’Kuli, M. Monsigny, E. Sonveaux, R. Wattiez, P.J. Courtoy // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – Vol. 28. – P. 868-874.
68. De Schutter K. RNAi-based biocontrol products: market status, regulatory aspects, and risk assessment / K. De Schutter, C.N.T. Taning, L. Van Daele, E.J.M. Van Damme, P. Dubrueel, G. Smagghe // *Frontiers in Insect Science*. – 2022. – Vol. 1. – P. 818037.
69. del Pino M. Phenology and Management of the White Mango Scale, *Aulacaspis tubercularis* Newstead (Hemiptera: Diaspididae), in Southern Spain / M. del Pino, J.M. Vela, J.R. Boyero, C. Bienvenido // *Phytoparasitica*. – 2021. – Vol. 49. – P. 459-477.
70. Dias N. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms / N. Dias, C.A. Stein // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2002. – Vol. 1. – P. 347-355.
71. Drohojowska J. Fossils Reshape the Sternorrhyncha Evolutionary Tree (Insecta, Hemiptera) / J. Drohojowska, J. Szwedo, D. Zylá, D.-Y. Huang, P. Müller // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – P. 11390.
72. Du J. Diamide insecticides targeting insect ryanodine receptors: Mechanism and application prospect / J. Du, Y. Fu // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2023. – Vol. 670. – P. 19-26.

73. Du Q. A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites / Q. Du, H. Thonberg, J. Wang, C. Wahlestedt, Z. Liang // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – Vol. 33, № 5. – P. 1671-1677.
74. Dubelman S. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils / S. Dubelman, J. Fischer, F. Zapata, K. Huizinga, C. Jiang, J. Uffman, S. Levine, D. Carson // *PLOS One*. – 2014. – Vol. 9, № 3. – P. e93155.
75. Dutcher J. D. A review of resurgence and replacement causing pest outbreaks in IPM / J. D. Dutcher // Ciancio A., Mukerji K.G. (eds). *General concepts in integrated pest and disease management. Integrated management of plants pests and diseases* Springer. – Dordrecht. – 2007. – Vol. 1. – P. 27-43.
76. El-Shesheny I. Silencing abnormal wing disc gene of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* disrupts adult wing development and increases nymph mortality / I. El-Shesheny, S. Hajeri, I. El-Hawary, S. Gowda, N. Killiny // *PLOS One*. – 2013. – Vol. 8. – P. e65392.
77. EPA. Environmental risk assessment for a FIFRA section 3 registration of the new product GS2 formulation (Calantha) containing ledprona [сайт]. URL: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2021-0271-0006> (дата обращения: 14.09.2024). – Текст электронный.
78. ExtractRNA. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://evrogen.ru/kit-user-manuals/extractRNA.pdf> (дата обращения: 02.08.2025). – Текст электронный.
79. Feinberg E. H. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1 / E. H. Feinberg, C. P. Hunter // *Science*. – 2003. – Vol. 301. – P. 1545-1547.
80. Fire A. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. / A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello // *Nature*. – 1998. – Vol. 391. – P. 806-811.
81. Fischer J.R. Aquatic fate of double stranded RNA in sediment-water system following an over-water application / J.R. Fischer, F. Zapata, S. Dubelman,

G.M. Mueller, J.P. Uffman, C. Jiang, P.D. Jensen, S.L. Levine // *Environmental Toxicology*. – 2016. – Vol. 36, № 3. – P. 727-734.

82. Flenniken M.L. Non-specific dsRNA-mediated antiviral response in the honey bee / M.L. Flenniken, R. Andino // *PLOS One*. – 2013. – Vol. 8, № 10. – P. e77263.

83. Mauvisseau Q. The multiple states of environmental DNA and what is known about their persistence in aquatic environments / Q. Mauvisseau, L. R. Harper, M. Sander, R. H. Hanner, H. Kleyer, K. Deiner // *Environmental Science & Technology*. – 2022. – Vol. 56, № 9. – P. 5322-5333.

84. Gadhav K. Aphid Transmission of Potyvirus: The Largest Plant-Infecting RNA Virus Genus / K. Gadhav, S. Gautam, D. Rasmussen, R. Srinivasan // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12, № 7. – P. 773.

85. Gagic V. Combined effects of agrochemicals and ecosystem services on crop yield across Europe / V. Gagic, D. Kleijn, A. Báldi, G. Boros, H.B. Jørgensen, Z. Elek, M.P.D. Garratt, G.A. de Groot, K. Hedlund, A. Kovács-Hostyánszki, L. E. Marini, Martin, I. Pevere, S.G. Potts, S. Redlich, D. Senapathi, I. Stefan-Dewenter, S. Świtek, H.G. Smith, V. Takács, P. Tryjanowski, W.H. van der Putten, S. van Gils, R. Bommarco // *Ecology Letters*. – 2017. – Vol. 20. – P. 1427-1436.

86. Gal'chinsky N. V. A breakthrough in the efficiency of contact DNA insecticides: rapid high mortality rates in the sap-sucking insects *Dynaspidiotus britannicus* Comstock and *Unaspis euonymi* Newstead / N. V. Gal'chinsky, R. Useinov, E. Yatskova, K. Laikova, I. Novikov, M. Gorlov, N. Trikoz, A. Sharmagiy, Y. Plugatar, V. Oberemok // *Journal of Plant Protection Research*. – 2020. – Vol. 60, № 2. – P. 220-223.

87. Gal'chinsky N. V. *Icerya purchasi* Maskell (Hemiptera: Monophlebidae) control using low carbon footprint oligonucleotide insecticides / N. V. Gal'chinsky, E. V. Yatskova, I. A. Novikov, R. Z. Useinov, N. J. Kouakou, K. F. Kouame, K. D. Kra, A. K. Sharmagiy, Y. V. Plugatar, K. V. Laikova, V. V. Oberemok // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 14. – P. 11650.

88. Gal'chinsky N. V. Mixed insect pest populations of Diaspididae species under control of oligonucleotide insecticides: 3'-end nucleotide matters / N. V. Gal'chinsky, E. V. Yatskova, I. A. Novikov, A. K. Sharmagiy, Y. V. Plugatar, V. V. Oberemok // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2024a. – Vol. 200. – P. 105838.
89. Gal'chinsky, N. Mixed insect pest populations of Diaspididae species under control of oligonucleotide insecticides / N. Gal'chinsky, E. Yatskova, I. Novikov, R. Useinov, A. Sharmagiy, Y. Laikova, Y. Plugatar, V. Oberemok // XX International Plant Protection Congress (1-5 July 2024). – Athens, 2024b.– P. 244
90. Gal'chinsky, N. Mode of action of oligonucleotide insecticides (DNA containment mechanism) / N. Gal'chinsky, V. Oberemok // XX International Plant Protection Congress (1-5 July 2024). – Athens, 2024. – P. 67.
91. Gal'chinsky, N. Oligonucleotide insecticides with low carbon footprint for green plant protection / N. Gal'chinsky, E. Yatskova, I. Novikov, A. Sharmagiy, Y. Plugatar, V. Oberemok // XX International Plant Protection Congress (1-5 July 2024). – Athens, 2024c. – P. 282.
92. Gal'chinsky, N. V. Environmentally friendly protection: use of a selective contact insecticide against holly scale (*Dynaspidiotus britannicus*) / N. V. Gal'chinsky, I. A. Novikov, E. V. Yatskova, A. K. Sharmagiy, Yu. V. Plugatar, V. V. Oberemok // In Vitro Biology Meeting (10-14 June 2023). – Norfolk, 2023b. – Animal. – Vol. 59. – P. S96–S97.
93. Gal'chinsky, N. V. First Record of High Mortality of the Cottony Cushion Scale After Application of the Contact DNA Insecticide / N. V. Gal'chinsky, R. Z. Useinov, I. A. Novikov, E. V. Yatskova, A. K. Sharmagiy, Yu. V. Plugatar, V. V. Oberemok // In Vitro Biology Meeting (5-9 June 2021). – Norfolk, 2021. – Animal.– Vol. 57. – P. S47.
94. Garbutt J. S. Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica* / J. S. Garbutt, X. Bellés, E. H. Richards, S. E. Reynolds // Journal of Insect Physiology. – 2013. – Vol. 59. – P. 171-178.

95. Gavrilova D. Antisense DNA acaricide targeting pre-rRNA of two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* as efficacy-enhancing agent of fungus *Metarhizium robertsii* / D. Gavrilova, E. Grizanova, I. Novikov, E. Laikova, A. Zenkova, V. Oberemok, I. Dubovskiy // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2025. – Vol. 211. – P. 108297
96. Geiger F. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland / F. Geiger, J. Bengtsson, F. Berendse, W. W. Weisser, M. Emmerson, M. B. Morales, P. Ceryngier, J. Liira, T. Tschardt, C. Winqvist, S. Eggers, R. Bommarco, T. Pärt, V. Bretagnolle, M. Plantegenest, L. W. Clement, C. Dennis, C. Palmer, J. J. Oñate, I. Guerrero, V. Hawro, T. Aavik, C. Thies, A. Flohre, S. Hänke, C. Fischer, P. W. Goedhart, P. Inchausti // *Basic and Applied Ecology*. – 2010. – Vol. 11. – P. 97-105.
97. Ghosh S. K. B. Double-stranded RNA oral delivery methods to induce RNA interference in phloem and plant-sap-feeding hemipteran insects / S. K. B. Ghosh, W. B. Hunter, A. L. Park, D. E. Gundersen-Rindal // *Journal of Visualized Experiments*. – 2018. – Vol. 135. – P. 57390.
98. Gonzalez J. G. Nuclease activity: an exploitable biomarker in bacterial infections / J. G. Gonzalez, F. J. Hernandez // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. – 2022. – Vol. 22, № 3. – P. 265-294.
99. GreenLight Biosciences. Non-Chemical Pesticide Alternative to Colorado Potato Beetle control [сайт]. URL: <https://www.greenlightbiosciences.com/calantha-for-cpb> (дата обращения: 02.08.2025). – Текст электронный.
100. Grewal A. Pesticide Residues in Food Grains, Vegetables and Fruits: A Hazard to Human Health / A. Grewal, A. Singla, P. Kamboj, J. Dua // *Journal of Medicinal Chemistry and Toxicology*. – 2017. – Vol. 2. – P. 1-7.
101. Grizanova E. V. RNAi-mediated suppression of insect metalloprotease inhibitor (IMPI) enhances *Galleria mellonella* susceptibility to fungal infection / E. V. Grizanova, C. J. Coates, T. M. Butt, I. M. Dubovskiy // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2021. – Vol. 122. – P. 104126.

102. Gruber C. Effective antiviral application of antisense in plants by exploiting accessible sites in the target RNA / C. Gruber, T. Gursinsky, S. Gago-Zachert, V. Pantaleo, S.E. Behrens // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24, № 24. – P. 17153.

103. Guan R. B. A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi / R. B. Guan, H. C. Li, Y. J. Fan, S. R. Hu, O. Christiaens, G. Smagghe, X. X. Miao // Journal of Biological Chemistry. – 2018. – Vol. 293, № 16. – P. 6011-6021.

104. Guidebook for the synthesis of oligonucleotides. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.chemie-brunschwig.ch/documents/suppliers-information/link-technologies/LI_LinkProductGuide201516.pdf (дата обращения: 02.08.2025). – Текст электронный.

105. Guo X. Comparison of RNAi knockdown effect of tyramine receptor 1 induced by dsRNA and siRNA in brains of the honey bee, *Apis mellifera* / X. Guo, Y. Wang, I. Sinakevitch, H. Lei, B. H. Smith // Journal of Insect Physiology. – 2018. – Vol. 111. – P. 47–52.

106. Guo Y. Aphid viruses: a brief view of a long history / Y. Guo, N. Ji, L. Bai, J. Ma, Z. Li // Frontiers in Insect Science. – 2022. – Vol. 2. – P. 846716.

107. Hafeez M. Metabolic-based insecticide resistance mechanism and ecofriendly approaches for controlling of beet armyworm *Spodoptera exigua*: a review / M. Hafeez, F. Ullah, M. M. Khan, X. Li, Z. Zhang, S. Shah, M. Imran, M. A. Assiri, G. M. Fernández-Grandon, N. Desneux, M. Rehman, S. Fahad, Y. Lu // Environmental Science and Pollution Research. – 2022. – Vol. 29. – P. 1746-1762.

108. Hamdan A-J. Flight activity and population dynamics of the *Olive psylla*, *Euphyllura olivina* Costa [Homoptera: Psyllidae] infesting ten olive cultivars in the Southern Highlands of West-Bank, Palestine / A-J. Hamdan, A. Alkam // American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences. – 2016. – Vol. 21. – P. 61–8.

109. Hancock P. A. Associated patterns of insecticide resistance in field populations of malaria vectors across Africa / P. A. Hancock, A. Wiebe, K. A. Gleave, S. Bhatt, E. Cameron, A. Trett, D. Weetman, D. L. Smith, J. Hemingway, M. Coleman,

P. W. Gething, C. L. Moyes // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2018. – Vol. 115, № 23. – P. 5938-5943.

110. Hardy N. B. The Biodiversity of Sternorrhyncha: Scale Insects, Aphids, Psyllids, and Whiteflies / N. B. Hardy // Insect Biodiversity: Science and Society. – 2018. – Vol. 2. – P. 591-625.

111. He L. RNAi-based pest control: production, application and the fate of dsRNA / L. He, Y. Huang, X. Tang // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Vol. 10. – P. 1080576.

112. Head G. P. Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management / G. P. Head, M. W. Carroll, S. P. Evans, D. M. Rule, A. R. Willse, T. L. Clark, N. P. Storer, R. D. Flannagan, L. W. Samuel, L. J. Meinke // Pest Management Science. – 2017. – Vol. 73, № 9. – P. 1883-1899.

113. Heimpel G. E. Environmental consequences of invasive species: greenhouse gas emissions of insecticide use and the role of biological control in reducing emissions / G. E. Heimpel, Y. Yang, J. D. Hill, D. W. Ragsdale // PLOS One. – 2013. – Vol. 8, № 8. – P. e72293.

114. Hirai M. Baculovirus and dsRNA induce Hemolin, but no antibacterial activity, in *Antheraea pernyi* / M. Hirai, O. Terenius, W. Li, I. Faye // Insect Molecular Biology. – 2004. – Vol. 13. – P. 399-405.

115. Hoang B. T. L. RNAi as a Foliar Spray: Efficiency and Challenges to Field Applications / B. T. L. Hoang, S. J. Fletcher, C. A. Brosnan, A. B. Ghodke, N. Manzie, N. Mitter // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 12. – P. 6639.

116. Hoddle M. Post release evaluation of *Rodolia cardinalis* (Coleoptera: Coccinellidae) for control of *Icerya purchasi* (Hemiptera: Monophlebidae) in the Galapagos Islands / M. Hoddle, C. Ramirez, C. Hoddle, C. Loayza, M. P. Lincango, R. Driesche, C. Causton // Biological Control. – 2013. – Vol. 67. – P. 262-274.

117. Hodoşan C. Pyrethrins and pyrethroids: a comprehensive review of natural occurring compounds and their synthetic derivatives / C. Hodoşan, C. E. Gîrd, M. V.

Ghica, C.-E. Dinu-Pîrvu, L. Nistor, I. S. Bărbuică, Ș.-C. Marin, A. Mihalache, L. Popa // *Plants*. – 2023. – Vol. 12. – P. 4022.

118. Hollowell H. Southern pine beetle-specific RNA interference exhibits no effect on model nontarget insects / H. Hollowell, L. K. Rieske // *Journal of Pest Science*. – 2022. – Vol. 95. – P. 1429-1441.

119. Howard J. D. Chemically modified dsRNA induces RNAi effects in insects in vitro and in vivo: a potential new tool for improving RNA-based plant protection / J. D. Howard, M. Beghyn, N. Dewulf, Y. De Vos, A. Philips, D. Portwood, P.M. Kilby, D. Oliver, W. Maddelein, S. Brown, M. J. Dickman // *Journal of Biological Chemistry*. – 2022. – Vol. 298, № 9. – P. 102311.

120. Hu R. Nucleic acid aptamers for pesticides, toxins, and biomarkers in agriculture / R. Hu, J. Shi, C. Tian, X. Chen, H. Zuo // *ChemPlusChem*. – 2022. – Vol. 87, № 11. – P. e202200230.

121. Hunter W. B. Improving Suppression of Hemipteran Vectors and Bacterial Pathogens of Citrus and Solanaceous Plants: Advances in Antisense Oligonucleotides (FANA) / W. B. Hunter, W. R. Cooper, A. F. Sandoval-Mojica, G. McCollum, V. Aishwarya, K. S. Pelz-Stelinski // *Frontiers in Agronomy*. – 2021. – Vol. 3. – P. 675247.

122. Hynes C. Regulatory role of RNA-binding proteins in microRNA biogenesis / C. Hynes, P. K. Kakumani // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2024. – Vol. 11. – P. 1374843.

123. Insight Ace. RNAi Pesticides Market [сайт]. URL: <https://www.insightaceanalytic.com/report/rnai-pesticides-market/2799> (дата обращения: 09.08.2025). – Текст электронный.

124. Irls P. RNAi reveals the key role of Nervana 1 in cockroach oogenesis and embryo development / P. Irls, F. A. Silva-Torres, M. D. Piulachs // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 43, № 2. – P. 178-88.

125. Jacquet F. Pesticide-free agriculture as a new paradigm for research / F. Jacquet, M. H. Jeuffroy, J. Jouan, E. Le Cadre, I. Litrico, T. Malausa, X. Reboud, C. Huyghe // *Agronomy for Sustainable Development*. – 2022. – Vol. 42, № 8. – P. 1-24.

126. Jaffar S. Contribution of insect gut microbiota and their associated enzymes in insect physiology and biodegradation of pesticides / S. Jaffar, S. Ahmad, Y. Lu // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 979383.
127. Jain R. G. Current scenario of RNAi-based hemipteran control / R. G. Jain, K. E. Robinson, S. Asgari, N. Mitter // *Pest Management Science*. – 2021. – Vol. 77, № 5. – P. 2188-2196.
128. Jain R. G. RNAi-Based Functional Genomics in Hemiptera / R. G. Jain, K. E. Robinson, S. J. Fletcher, N. Mitter // *Insects*. – 2020. – Vol. 11. – P. 557.
129. Jegede O. O. Temperature influences the toxicity of deltamethrin, chlorpyrifos and dimethoate to the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Acari) and the springtail *Folsomia candida* (Collembola) / O. O. Jegede, O. J. Owojori, J. Rombke // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2017. – Vol. 140. – P. 214-221.
130. Joga M. R. RNA Interference-Based Forest Protection Products (FPPs) Against Wood-Boring Coleopterans: Hope or Hype? / M. R. Joga, K. Mogilicherla, G. Smagghe, A. Roy // *Frontiers in Plant Science*. – 2021. – Vol. 12. – P. 733608.
131. Jose A. M. Transport of sequence specific RNA interference information between cells / A. M. Jose, C. P. Hunter // *Annual Review of Genetics*. – 2007. – Vol. 41. – P. 305-330.
132. Juliano R. L. Cellular uptake and intracellular trafficking of oligonucleotides: implications for oligonucleotide pharmacology / R. L. Juliano, X. Ming, K. Carver, B. Laing // *Nucleic Acid Therapeutics*. – 2014. – Vol. 24. – P. 101-113.
133. Kalyabina V. P. Pesticides: formulants, distribution pathways and effects on human health—a review / V. P. Kalyabina, E. N. Esimbekova, K. V. Kopylova, V. A. Kratasyuk // *Toxicology Reports*. – 2021. – Vol. 8. – P. 1179-1192.
134. Katoch R. RNAi for insect control: current perspective and future challenges / R. Katoch, A. Sethi, N. Thakur, L. L. Murdock // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 171. – P. 847-873.
135. Kayama K. Prediction of PCR amplification from primer and template sequences using recurrent neural network / K. Kayama, M. Kanno, N. Chisaki, M.

Tanaka, R. Yao, K. Hanazono, G.A. Camer, D. Endoh // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 7493.

136. Khaghaninia S. Effect of emulsifiable oil on overwintering adults of olive psyllid *Euphyllura olivina* Costa (Hom.: Aphalaridae) and its phytotoxicity on olive trees in Tarom region-Iran / S. Khaghaninia // Munis Entomology & Zoology Journal. – 2009. – Vol. 4. – P. 486–92.

137. Khajuria C. Development and characterization of the first dsRNA-resistant insect population from western corn rootworm, *Diabrotica Virgifera Virgifera* LeConte / C. Khajuria, S. Ivashuta, E. Wiggins, L. Flagel, W. Moar, M. Pleau, K. Miller, Y. Zhang, P. Ramaseshadri, C. Jiang, T. Hodge, P. Jensen, M. Chen, A. Gowda, B. McNulty, C. Vazquez, R. Bolognesi, J. Haas, G. Head, T. Clark // PLOS One. – 2018. – Vol. 13, № 5. – P. e0197059.

138. Khursheed A. Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: a comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects / A. Khursheed, M. A. Rather, V. Jain, A. R. Wani, S. Rasool, R. Nazir, A. N. Malik, S. A. Majid // Microbial Pathogenesis. – 2022. – Vol. 173. – P. 105854.

139. Killiny N. Doublestranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five CYP4 genes and suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri* / N. Killiny, S. Hajeri, S. Tiwari, S. Gowda, L. L. Stelinski // PLOS One. – 2014. – Vol. 9. – P. e110536.

140. Klabenkova K. Chemistry of peptideoligonucleotide conjugates: a review / K. Klabenkova, A. Fokina, D. Stetsenko // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – P. 5420.

141. Klich D. Pesticides and Conservation of Large Ungulates: Health Risk to European Bison from Plant Protection Products as a Result of Crop Depredation / D. Klich, R. Łopucki, A. Stachniuk, M. Sporek, E. Fornal, M. Wojciechowska, W. Olech // PLOS One. – 2020. – Vol. 15. – P. e0228243.

142. Kliot A. Fitness costs associated with insecticide resistance / A. Kliot, M. Ghanim // Pest Management Science. – 2012. – Vol. 68, № 11. – P. 1431-1437.

143. Komal J. Unveiling the Genetic Symphony: Harnessing CRISPR-Cas Genome Editing for Effective Insect Pest Management / J. Komal, H. R. Desai, I. Samal, A. Mastinu, R. D. Patel, P. V. D. Kumar, P. K. Majhi, D. K. Mahanta, T. K. Bhoi // *Plants*. – 2023. – Vol. 12. – P. 3961.
144. Kondo T. Encyclopedia of scale insect pests / T. Kondo, G. W. Watson // CABI, Wallingford, UK. – 2022. – P. 249-251.
145. Koo J. Recent advances in understanding of the mechanisms of RNA interference in insects / J. Koo, S. R. Palli // *Insect Molecular Biology*. – 2024. – Vol. 34, № 4. – P. 1-14.
146. Krieg A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects / A. M. Krieg // *Annual Review of Immunology*. – 2002. – Vol. 20. – P. 709-760.
147. Kunte N. Prospects, challenges and current status of RNAi through insect feeding / N. Kunte, E. McGraw, S. Bell, D. Held, L-A. Avila // *Pest Management Science*. – 2020. – Vol. 76. – P. 26-41.
148. Lavergne S. Increased genetic variation and evolutionary potential drive the success of an invasive grass / S. Lavergne, J. Molofsky // *Proceedings National Academy Science USA*. – 2007. – Vol. 104. – P. 3883-3888.
149. Lazarević-Pašti T. With or Without You?-A Critical Review on Pesticides in Food / T. Lazarević-Pašti, V. Milanković, T. Tasić, S. Petrović, A. Leskovac // *Foods*. – 2025. – Vol. 14, № 7. – P. 1128.
150. Li Z. Nanochitin whisker enhances insecticidal activity of chemical pesticide for pest insect control and toxicity / Z. Li, H. Wang, S. An, X. Yin // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2021. – Vol. 19, № 1. – P. 49.
151. Locke M. Permeability of insect cuticle to water and lipids / M. Locke // *Science*. – 1965. – Vol. 147, № 3655. – P. 295-298.
152. Loke S. L. Characterization of oligonucleotide transport in to living cells / S. L. Loke, C. A. Stein, X. H. Zhang, K. Mori, M. Nakanishi, C. Subasinghe, J.S. Cohen, L. M. Neckers // *Proceeding National Academy Science USA*. – 1989. – Vol. 86. – P. 3474-3478.

153. Lomate P. R. Distinct properties of proteases and nucleases in the gut, salivary gland and saliva of southern green stink bug. *Nezara Viridula* / P. R. Lomate, B.C. Bonning // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – P. 27587.

154. Lorenz T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies / T. C. Lorenz // Journal of Visualized Experiments. – 2012. – Vol. 63. – P. e3998.

155. Lucena-Leandro V. S. Current scenario of exogenously induced RNAi for lepidopteran agricultural pest control: from dsRNA design to topical application / V. S. Lucena-Leandro, E. F. A. Abreu, L. A. Vidal, C. R. Torres, C. I. C. V. F. Junqueira, J. Dantas, É. V. S. Albuquerque // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 24. – P. 15836.

156. Luige O. Influence of sequence variation on the RNA cleavage activity of Zn²⁺-dimethyl-dppz-PNA-based artificial enzymes / O. Luige, K. Karalè, P. P. Bose, M. Bollmark, U. Tedebark, M. Murtola, R. Strömberg // RSC Advances. – 2022. – Vol. 22. – P. 5398-5406.

157. Ma Y. F. Nanoparticle-delivered RNAi-based pesticide target screening for the rice pest white-backed planthopper and risk assessment for a natural predator / Y. F. Ma, Y. Q. Zhao, Y. Y. Zhou, H. Y. Feng, L. L. Gong, M. Q. Zhang, J. J. Hull, Y. Dewar, A. Roy, G. Smaghe, M. He, P. He // Science of the Total Environment. – 2024. – Vol. 926. – P. 171286.

158. Mannino M. C. Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi / M. C. Mannino, C. Huarte-Bonnet, B. Davyt-Colo, N. Pedrini // Journal of Fungi (basel). – 2019. – Vol. 5, № 2. – P. 33.

159. Mao K. The influence of temperature on the toxicity of insecticides to *Nilaparvata lugens* (Stål) / K. Mao, R. Jin, W. Li, Z. Ren, X. Qin, S. He, J. Li, H. Wan // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2019. – Vol. 156. – P. 80-86.

160. Matranga C. Double-stranded RNA-dependent ATPase DRH-3: Insight into its role in RNA silencing in *Caenorhabditis elegans* / C. Matranga, A. M. Pyle // Journal of Biological Chemistry. – 2010. – Vol. 285, № 33. – P. 25363-25371.

161. Matranga C. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes / C. Matranga, Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel, P. D. Zamore // *Cell*. – 2005. – Vol. 123, № 4. – P. 607-620.
162. Meitha K. Green pesticide: tapping to the promising roles of plant secreted small RNAs and responses towards extracellular DNA / K. Meitha, R. R. Esyanti, R. H. Iriawati Hanisia, D. Rohyani // *Non-coding RNA Research*. – 2021. – Vol. 6, № 1. – P. 42-50.
163. Ming X. Cellular delivery of siRNA and antisense oligonucleotides via receptor-mediated endocytosis / X. Ming // *Expert Opinion on Drug Delivery*. – 2011. – Vol. 8. – P. 435-449.
164. Misaka B. C. Genetic Diversity of *Bemisia Tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) Colonizing Sweet Potato and Cassava in South Sudan / B. C. Misaka, E. N. Wosula, P. W. Marchelo-d'Ragga, T. Hvoslef-Eide, J. P. Legg // *Insects*. – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 58.
165. Mishra S. Selection for high levels of resistance to double-stranded RNA (dsRNA) in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) using non-transgenic foliar delivery / S. Mishra, J. Dee, W. Moar, J. Dufner-Beattie, J. Baum, N. P. Dias, A. Alyokhin, A. Buzza, S. I. Rondon, M. Clough, S. Menasha, R. Groves, J. Clements, K. Ostlie, G. Felton, T. Waters, W. E. Snyder, J. L. Jurat-Fuentes // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – P. 6523.
166. Mogilicherla K. RNAi-chitosan biopesticides for managing forest insect pests: an outlook / K. Mogilicherla, A. Roy // *Frontiers in Forests and Global Change*. – 2023. – Vol. 6. – P. 219685.
167. Moody E. R. An enzyme cascade enables production of therapeutic oligonucleotides in a single operation / E. R. Moody, R. Obexer, F. Nickl, R. Spiess, S. L. Lovelock // *Science*. – 2023. – Vol. 380, № 6650. – P. 1150-1154.
168. Mulcahy H. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source / H. Mulcahy, L. Charron-Mazenod, S. Lewenza // *Environmental Microbiology*. – 2010. – Vol. 12. – P. 1621-1629.

169. Mulé R. Systematic review of the effects of chemical insecticides on four common butterfly families / R. Mulé, G. Sabella, L. Robba, B. Manachini // *Frontiers in Environmental Science*. – 2017. – Vol. 5. – P. 32.

170. Mutah N. P. DNA insecticides: the lethal potency of LdMNPV IAP-2 gene antisense oligonucleotides in pre-infected gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) larvae / N. P. Mutah, A. T. Adesoji // *International Journal of Pest Management*. – 2017. – Vol. 64, № 2. – P. 173-177.

171. Muth F. A neonicotinoid pesticide impairs foraging, but not learning, in free-flying bumblebees / F. Muth, A. S. Leonard // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – P. 4764.

172. Mwanauta R. W. Characterization of Farmer's Knowledge and Management Practices of Papaya Mealybug *Paracoccus Magnatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Tanzania / R. W. Mwanauta, P. A. Ndakidemi, P. B. Venkataramana // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2022. – Vol. 29. – P. 3539-3545.

173. Namias A. The need for practical insecticide-resistance guidelines to effectively inform mosquito-borne disease control programs / A. Namias, N. B. Jobe, K. P. Paaijmans, S. Huijben // *eLife*. – 2021. – Vol. 10. – P. e65655.

174. Nansen C. Behavioral avoidance – will physiological insecticide resistance level of insect strains affect their oviposition and movement responses? / C. Nansen, O. Baissac, M. Nansen, K. Powis, G. Baker // *PLOS One*. – 2016. – Vol. 11, № 3. – P. e0149994.

175. Narva K. Insecticide resistance management scenarios differ for RNA-based sprays and traits / K. Narva, U. Toprak, A. Alyokhin, R. Groves, J.L. Jurat-Fuentes, W. Moar, R. Nauen, S. Whipple, G. Head // *Insect Molecular Biology*. – 2025. – Vol. 34, № 4. – P. 518-526.

176. Navas-Castillo J. Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies / J. Navas-Castillo, E. Fiallo-Olivé, S. Sánchez-Campos // *Annual Review of Phytopathology*. – 2011. – Vol. 49. – P. 219-248.

177. Ngumbi E. N. Factors associated with variation in cuticular hydrocarbon profiles in the navel orange worm, *Amyelois transitella* (Lepidoptera: Pyralidae) / E. N. Ngumbi, L. M. Hanks, A. V. Suarez, J. G. Millar, M. R. Berenbaum // Journal of Chemical Ecology. – 2020. – Vol. 46. – P. 40-47.

178. Niu J. Topical dsRNA delivery induces gene silencing and mortality in the pea aphid / J. Niu, W. J. Yang, Y. Tian, J. Y. Fan, C. Ye, F. Shang, B. Y. Ding, J. Zhang, X. An, L. Yang, T. Y. Chang, O. Christiaens, G. Smagghe, J. J. Wang // Pest Management Science. – 2019. – Vol. 75, № 11. – P. 2873-2881.

179. Nurul Huda A. Pollination services of mango flower pollinators / A. Nurul Huda, M. R. Che Salmah, A. Abu Hassan, A. Hamdan, M. N. Abdul Razak // Journal of Insect Science. – 2015. – Vol. 15, № 1. – P. 113.

180. Nyadar P. M. DNA insecticides: the effect of concentration on nontarget plant organisms such as wheat (*Triticum aestivum* L.) / P. M. Nyadar, V. Oberemok, A. Omelchenko, S. Kerimova, E. Seidosmanova, A. Krasnodubiets, M. Shumskykh, V. Bekirova, N. Gal'chinsky, V. Vvdensky // Journal of Plant Protection Research. – 2019. – Vol. 59, № 1. – P. 60-68.

181. Nyadar P. M. DNA insecticides: the lethal potency of LdMNPV IAP-2 gene antisense oligonucleotides in pre-infected gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) larvae / P. M. Nyadar, T. A. Adeyemi // International Journal of Pest Management. – 2018. – Vol. 64, № 2. – P. 173-177.

182. Oberemok V. DNA-Programmable Oligonucleotide Insecticide Eriola-11 Targets Mitochondrial 16S rRNA and Exhibits Strong Insecticidal Activity Against Woolly Apple Aphid (*Eriosoma lanigerum*) Hausmann / V. Oberemok, K. Laikova, O. Andreeva, A. Dmitrienko, T. Rybareva, J. Ali, N. Gal'chinsky // International Journal of Molecular Sciences. – 2025a. – Vol. 26, № 15. – P. 7486.

183. Oberemok V. Ribosomal RNA-Specific Antisense DNA and Double-Stranded DNA Trigger rRNA Biogenesis and Insecticidal Effects on the Insect Pest *Coccus hesperidum* / V. Oberemok, N. Gal'chinsky, I. Novikov, A. Sharmagiy, E. Yatskova, E. Laikova, Y. Plugatar // International Journal of Molecular Sciences. – 2025c. – Vol. 26, № 15. – P. 7530.

184. Oberemok V. V. A half-century history of applications of antisense oligonucleotides in medicine, agriculture and forestry: we should continue the journey / V. V. Oberemok, K. V. Laikova, A. I. Repetskaya, I. M. Kenyo, M. V. Gorlov, I. N. Kasich, A. M. Krasnodubets, N. V. Gal'chinsky, I. I. Fomochkina, A. S. Zaitsev, V. V. Bekirova, E. E. Seidosmanova, K. I. Dydik, A. O. Meshcheryakova, S. A. Nazarov, N. N. Smagliy, E. L. Chelengerova, A. A. Kulanova, K. Deri, M. V. Subbotkin, R. Z. Useinov, M. N. Shumskykh, A. V. Kubyshkin // *Molecules*. – 2018a. – Vol. 23, № 6. – P. 1302.

185. Oberemok V. V. A primary attempt of *Leptinotarsa decemlineata* control using contact DNA insecticide based on short antisense oligonucleotide of its CYP6B gene / V. V. Oberemok, K. Laikova, M. Shumskykh, I. Kenyo, I. Kasich, K. Deri, E. Seidosmanova, K. Krasnodubets, V. Bekirova, N. Gal'chinsky // *Journal of Plant Protection Research*. – 2018b. – Vol. 58. – P. 106-108.

186. Oberemok V. V. A short history of insecticides / V. V. Oberemok, K. V. Laikova, Y. I. Gninenko, A. S. Zaitsev, P. M. Nyadar, T.A. Adeyemi // *Journal of Plant Protection Research*. – 2015a. – Vol. 55, №3. – P. 221-226.

187. Oberemok V. V. Biodegradation of insecticides: oligonucleotide insecticides and double-stranded RNA biocontrols paving the way for eco-innovation / V. V. Oberemok, K. V. Laikova, O. A. Andreeva, N. V. Gal'chinsky // *Frontiers in Environmental Science*. – 2024c. – Vol. 12. – P. 1430170.

188. Oberemok V. V. Contact unmodified antisense DNA (CUAD) biotechnology: list of pest species successfully targeted by oligonucleotide insecticides / V. V. Oberemok, K. V. Laikova, N. V. Gal'chinsky // *Frontiers in Agronomy*. – 2024a. – Vol. 6. – P. 1415314.

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

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

191. Oberemok V. V. Four most pathogenic superfamilies of insect pests of suborder Sternorrhyncha: invisible superplunderers of plant vitality / V. V. Oberemok, N. V. Gal'chinsky, R. Z. Useinov, I. A. Novikov, Y. V. Puzanova, R. I. Filatov, N. J. Kouakou, K. F. Kouame, K. D. Kra, K. V. Laikova // Insects. – 2023. – Vol. 14. – P. 462.

192. Oberemok V. V. Insecticidal activity of three 10–12 nucleotides long antisense sequences from 5.8S ribosomal RNA gene of gypsy moth *Lymantria dispar* L. against its larvae / V. V. Oberemok, K. V. Laikova, R. F. Useinov, N. V. Gal'chinsky, I. A. Novikov, K. A. Yurchenko, M. E. Volkov, M. V. Gorlov, V. A. Brailko, Y. V. Plugatar // Journal of Plant Protection Research. – 2019b. – Vol. 59, №4. – P. 561-564.

193. Oberemok V. V. Molecular alliance of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus and a short unmodified antisense oligonucleotide of its anti-apoptotic IAP-3 gene: a novel approach for gypsy moth control / V. V. Oberemok, K. V. Laikova, A. S. Zaitsev, M. N. Shumskykh, I. N. Kasich, N. V. Gal'chinsky, V. V. Bekirova, V. V. Makarov, A. A. Agranovsky, V. A. Gushchin, I. V. Zubarev, A. V. Kubyshkin, I. I. Fomochkina, M. V. Gorlov, O. A. Skorokhod // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – Vol. 18. – P. 2446.

194. Oberemok V. V. Oligonucleotide insecticides and RNA-based insecticides: 16 years of experience in contact using of the next generation pest control agents / V. V. Oberemok, K. V. Laikova, O. A. Andreeva, N. V. Gal'chinsky // Journal of Plant Diseases and Protection. – 2024d. – Vol. 131. – P. 1837-1852.

195. Oberemok V. V. Oligonucleotide insecticides for green agriculture: regulatory role of contact DNA in plant insect interactions / V. V. Oberemok, R. Z. Useinov, O. A. Skorokhod, N. V. Gal'chinsky, I. A. Novikov, T. P. Makalish, E. V. Yatskova, A. K. Sharmagi, I. O. Golovkin, Y. I. Gninenko, Y. V. Puzanova, O. A.

Andreeva, E. E. Alieva, E. Eken, K. V. Laikova, Y. V. Plugatar // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 24. – P. 15681.

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

197. Oberemok V. V. Potent and selective 'genetic zipper' method for DNA-programmable plant protection: innovative oligonucleotide insecticides against *Trioza alacris* Flor. / V. V. Oberemok, I. A. Novikov, E. V. Yatskova, A. I. Bilyk, A. K. Sharmagiy, N. V. Gal'chinsky // Chemical and Biological Technologies in Agriculture. – 2024e. – Vol. 11, № 144 – P. 144.

198. Oberemok V. V. The 'genetic zipper' method offers a cost-effective solution for aphid control / V. V. Oberemok, Y. V. Puzanova, N. V. Gal'chinsky // Frontiers in Insect Science. – 2024b. – Vol. 4. – P. 1467221.

199. Oberemok V. V. The RING for gypsy moth control: topical application of fragment of its nuclear polyhedrosis virus antiapoptosis gene as insecticide / V. V. Oberemok, K. V. Laikova, A. S. Zaitsev, V. A. Gushchin, O. A. Skorokhod // Pesticide Biochemistry and Physiology – 2016. – Vol. 131. – P. 32-39.

200. Oberemok V. V. Toward Global Pesticide Market: Notes on Using of Innovative 'Genetic Zipper' Method / V. V. Oberemok, K. V. Laikova, N. V. Gal'chinsky // Indian Journal of Entomology. – 2025b. – P. 1-4.

201. Oberemok, V. Contact unmodified antisense DNA (CUAD) biotechnology: oligonucleotide insecticides as the next-generation plant protection product for green agriculture / V. Oberemok, N. Gal'chinsky, I. Novikov, Y. Laikova // XX International Plant Protection Congress (1-5 July 2024). – Athens, 2024g. – P. 200.

202. Oberemok, V. Oligonucleotide insecticides: low-cost innovation for eco-friendly aphid control and an asymptote for current chemical insecticides / V. Oberemok, N. Gal'chinsky, Y. Puzanova, Y. Laikova // XX International Plant Protection Congress (1-5 July 2024). – Athens, 2024f. – P. 113.

203. Oberemok, V. V. High Mortality of Sap-sucking Insects One Week After Topical Application of DNA Insecticides / V. V. Oberemok, K. V. Laikova, R. Z. Useinov, N. V. Gal'chinsky, I. A. Novikov, M. V. Gorlov, E. B. Balykina, N. N. Trikoz, E. V. Yatskova, A. K. Sharmagiy, Yu. V. Plugatar // World Congress on In Vitro Biology, Virtual Pre-Recorded Meeting (6–10 June 2020). – San Diego, 2020. – Plant. – Vol. 56. – P. S39.

204. OECD. Considerations for the environmental risk assessment of the application of sprayed or externally applied dsRNA-based pesticides. – Paris, 2020. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO\(2020\)25/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO(2020)25/en/pdf) (дата обращения: 02.08.2025). – Текст электронный.

205. Okamoto T. Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution / T. Okamoto, S. Okabe // International Journal of Molecular Medicine. – 2000. – Vol. 5. – P. 657-659.

206. Pallis S. Effects of Low Doses of a Novel dsRNA-based Biopesticide (*Calantha*) on the Colorado Potato Beetle / S. Pallis, A. Alyokhin, B. Manley, T. Rodrigues, E. Barnes, K. Narva // Journal of Economic Entomology. – 2023. – Vol. 116, № 2. – P. 456-461.

207. Pampolini F. Emerald ash borer specific gene silencing has no effect on non-target organisms / F. Pampolini, L. K. Rieske // Frontiers in Agronomy. – 2020. – Vol. 2. – P. 608827.

208. PAN. Linking fossil fuels and pesticides to greenhouse gases [сайт]. URL: <https://www.panna.org/news/linking-fossil-fuels-and-pesticides-to-greenhouse-gases/> (дата обращения: 02.08.2025). – Текст электронный.

209. Paparella A. A Review of the Botany, Volatile Composition, Biochemical and Molecular Aspects, and Traditional Uses of *Laurus nobilis* / A. Paparella, B. Nawade, L. Shaltiel-Harpaz, M. Ibdah // Plants. – 2022. – Vol. 11, № 9. – P. 1209.

210. Parker K. M. Environmental Fate of RNA Interference Pesticides: Adsorption and Degradation of Double-Stranded RNA Molecules in Agricultural Soils / K. M. Parker, V. Barragán Borrero, D. M. van Leeuwen, M. A. Lever, B. Mateescu, M.

Sander // Environmental science & Technology. – 2019. – Vol. 53, № 6. – P. 3027-3036.

211. Patent CZ 300093B6. Process for Preparing Thiamethoxam: publ. 28.01.2009 / Seifer G, Rapold T, Gisin V.

212. Patent WO2016160936A1. Cell-free production of ribonucleic acid: publ. 06.10.2016 / Blake W. J., Cunningham D.S., Maceachran D.

213. Pathak V. M. Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation: a comprehensive review / V. M. Pathak, V. K. Verma, B. S. Rawat, B. Kaur, N. Babu, A. Sharma, S. Dewali, M. Yadav, R. Kumari, S. Sing, A. Mohapatra, V. Pandey, N. Rana, J. M. Cunill // Frontiers in Microbiology. – 2022. – Vol. 13. – P. 962619.

214. Patil V. Advances in Antisense Oligo Technology for Sustainable Crop Protection / V. Patil, S. Jangra, A. Ghosh // Critical Reviews in Plant Sciences. – 2024. – Vol. 43, № 6. – P. 1-23.

215. Payton Miller T. L. Banker Plants for Aphid Biological Control in Greenhouses / T. L. Payton Miller, E. J. Rebek // Journal of Integrated Pest Management. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 9.

216. Peng Y. Biochemical comparison of dsRNA degrading nucleases in four different insects / Y. Peng, K. Wang, W. Fu, C. Sheng, Z. Han // Frontiers in Physiology. – 2018. – Vol. 9. – P. 624.

217. Petar K. Impact of short-term heat pretreatment at 50 °C on the toxicity of contact insecticides to adults of three *Sitophilus granarius* (L.) populations / K. Petar, A. Goran, P. Ilija // Journal of Stored Products Research. – 2009. – Vol. 45. – P. 272-278.

218. Pinheiro D. H. Clathrin-dependent endocytosis is associated with RNAi response in the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte / D. H. Pinheiro, A. M. Velez, E. Fishilevich, H. Wang, N. P. Carneiro, A. Valencia-Jimenez, F. H. Valicente, K. E. Narva, B. D. Siegfried // PLOS One. – 2018. – Vol. 13, № 8. – P. e0201849.

219. Pirali-Kheirabadi K. Biological activities of chamomile (*Matricaria chamomile*) flowers' extract against the survival and egg laying of the cattle fever tick (Acari Ixodidae) / K. Pirali-Kheirabadi, M. Razzaghi-Abyaneh // Journal of Zhejiang University Science B. – 2007. – Vol. 8, № 9. – P. 693-696.

220. Powell M. Insecticidal effects of dsRNA targeting the Diap1 gene in dipteran pests / M. Powell, P. Pyati, M. Cao, H. Bell, J. A. Gatehouse, E. Fitches // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, № 15147. – P. 1-13.

221. Prado A. Insect pollination: an ecological process involved in the assembly of the seed microbiota / A. Prado, B. Marolleau, B.E. Vaissière, M. Barret, G. Torres-Cortes // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 3575.

222. Prasad K. V. H. Factors responsible for abundance of insects / K. V. H. Prasad // Insect ecology concepts to management Springer, Singapore. – 2022. – P. 17-21.

223. Pridgeon J. W. Erratum. Topically applied AaeIAP1 double stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti* / J. W. Pridgeon, L. Zhao, J. J. Becnel, D. A. Strickman, G. G. Clark, K. J. Linthicum // Journal of Medical Entomology. – 2016. – Vol. 53, № 2. – P. 484.

224. Pridgeon J. W. Topically applied AaeIAP1 double stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti* / J. W. Pridgeon, L. Zhao, J. J. Becnel, D. A. Strickman, G. G. Clark, K. J. Linthicum // Journal of Medical Entomology. – 2008. – Vol. 45. – P. 414-420.

225. Priti, Mukherjee S. K. Silencing of *Thrips palmi* *UHRF1BP1* and *PFAS* Using Antisense Oligos Induces Mortality and Reduces Tosspovirus Titer in Its Vector / S. K. Priti, Mukherjee, A. Ghosh // Pathogens. – 2022. – Vol. 11, № 11. – P. 1319.

226. Puglise J. M. Expression profiles and RNAi silencing of inhibitor of apoptosis transcripts in *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) / J. M. Puglise, A. S. Estep, J. J. Becnel // Journal of Medical Entomology. – 2015. – Vol. 53, № 2. – P. 304-314.

227. Puzanova Y. V. Perfect complementarity mechanism for aphid control: oligonucleotide insecticide macsan-11 selectively causes high mortality rate for *Macrosiphoniella sanborni* Gillette / Y. V. Puzanova, I. A. Novikov, A. I. Bilyk, A. K. Sharmagiy, Y. V. Plugatar, V. V. Oberemok // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24, № 14. – P. 11690.
228. Rank A. P. Lab-to-field transition of RNA spray applications – how far are we? / A. P. Rank, A. Koch // Frontiers in Plant Science. – 2021. – Vol. 12. – P. 755203.
229. Redfern M. British plant galls. 2nd ed. / M. Redfern, P. Shirley, M. Bloxham // Shrewsbury: FSC Publications. – 2011. – P. 246.
230. Remington A. The DNases of pathogenic Lancefield streptococci / A. Remington, C. E. Turner // Microbiology. – 2018. – Vol. 164, № 3. – P. 242-250.
231. Rezende-Teixeira P. What can we learn from commercial insecticides? Efficacy, toxicity, environmental impacts, and future developments / P. Rezende-Teixeira, R. G. Dusi, P. C. Jimenez, L. S. Espindola, L. V. Costa-Lotufo // Environmental Pollution. – 2022. – Vol. 300. – P. 118983.
232. Roberts A. F. Biosafety research for nontarget organism risk assessment of RNAi-based GE plants / A. F. Roberts, Y. Devos, G. Lemgo // Frontiers in Plant Science. – 2015. – Vol. 6. – P. 958.
233. Rodrigues T. B. Development of RNAi method for screening candidate genes to control emerald ash borer, *Agilus planipennis* / T. B. Rodrigues, L. K. Rieske, J. J. Duan, K. Mogilicherla, S. R. Palli // Scientific Reports. – 2017b. – Vol. 7, № 7379. – P. 1-8.
234. Rodrigues T. B. First sprayable double-stranded RNA-based biopesticide product targets proteasome subunit beta type-5 in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) / T. B. Rodrigues, S. K. Mishra, K. Sridharan, E. R. Barnes, A. Alyokhin, R. Tuttle, W. Kokulapalan, D. Garby, N. J. Skizim, Y. W. Tang, B. Manley, L. Aulisa, R. D. Flannagan, C. Cobb, K. E. Narva // Frontiers in Plant Science. – 2021. – Vol. 12. – P. 728652.
235. Rodrigues T. B. RNA interference in the Asian Longhorned Beetle: Identification of Key RNAi Genes and Reference Genes for RT-qPCR / T. B.

Rodrigues, R. K. Dhandapani, J. J. Duan, S. R. Palli // *Scientific Reports*. – 2017a. – Vol. 7, № 1. – P. 8913.

236. Rodrigues T. B. Safety considerations for humans and other vertebrates regarding agricultural uses of externally applied RNA molecules / T. B. Rodrigues, J. S. Petrick // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – Vol. 11. – P. 407.

237. Rolff J. Complete metamorphosis of insects / J. Rolff, P.R. Johnston, S. Reynolds // *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biology Science*. – 2019. – Vol. 374. – P. 1-8.

238. Romeis J. Assessing the risks of topically applied dsRNA-based products to non-target arthropods / J. Romeis, F. Widmer // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – Vol. 11. – P. 679.

239. Rosa L. Achieving net-zero emissions in agriculture: a review / L. Rosa, P. Gabrielli // *Environmental Research Letters*. – 2023. – Vol. 18, № 6. – P. 063002.

240. Ross L. Scale insects / L. Ross, D. M. Shuker // *Current Biology*. – 2009. – Vol. 19, № 5. – P. 184-186.

241. Saleh M. C. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing / M. C. Saleh, R. P. van Rij, A. Hekele, A. Gillis, E. Foley, P. H. O'Farrell, R. Andino // *Nature Cell Biology*. – 2006. – Vol. 8. – P. 793-802.

242. Sánchez-Bayo F. Indirect effect of pesticides on insects and other arthropods / F. Sánchez-Bayo // *Toxics*. – 2021. – Vol. 9, № 8. – P.177.

243. Sánchez-Bayo F. Worldwide decline of the entomofauna: a review of its drivers / F. Sánchez-Bayo, K. A. Wyckhuys // *Biological Conservation*. – 2019. – Vol. 232. – P. 8-27.

244. Sandoval-Mojica A. F. Antibacterial FANA oligonucleotides as a novel approach for managing the Huanglongbing pathosystem / A. F. Sandoval-Mojica, W. B. Hunter, V. Aishwarya, S. Bonilla, K. S. Pelz-Stelinski // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 2760.

245. Santos D. Systemic RNA interference in locusts: reverse genetics and possibilities for locust pest control / D. Santos, J. Vanden Broeck, N. Wynant // *Current Opinion in Insect Science*. – 2014. – Vol. 6. – P. 9-14.

246. Santos-Ortega Y. Silencing of sucrose hydrolase causes nymph mortality and disturbs adult osmotic homeostasis in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) / Y. Santos-Ortega, N. Killiny // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2018. – Vol. 101. – P. 131-143.

247. Sarkar S.C. Tomato potato psyllid *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) in Australia: incursion, potential impact and opportunities for biological control / S.C. Sarkar, S. Hatt, A. Philips, M. Akter, S.P. Milroy, W. Xu // *Insects*. – 2023. – Vol. 14, № 3. – P. 263.

248. Sarwar M. Insecticides resistance in insect pests or vectors and development of novel strategies to combat its evolution / M. Sarwar, M. Salman // *International Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering*. – 2015. – Vol. 1, № 3. – P. 344-351.

249. Satpute N. S. Temperature-dependent variation in toxicity of insecticides against *Earias vitella* (Lepidoptera: Noctuidae) / N. S. Satpute, S. D. Deshmukh, N. G. V. Rao, S. N. Tikar, M. P. Moharil, S. A. Nimbalkar // *Journal of Economic Entomology*. – 2007. – Vol. 100, № 2. – P. 357-360.

250. Saurabh S. Tiny Flies: A Mighty Pest That Threatens Agricultural Productivity—A Case for Next-Generation Control Strategies of Whiteflies / S. Saurabh, M. Mishra, P. Rai, R. Pandey, J. Singh, A. Khare, M. Jain, P.K. Singh // *Insects*. – 2021. – Vol. 12. – P. 585.

251. Scott J. G. Effects of temperature on insecticide toxicity / J. G. Scott // Roe R. M., Kuhr R. J. (eds.). *Reviews in pesticide toxicology*. Raleigh, NC, USA. – 1995. – Vol. 3. – P. 111-135.

252. Shaffer L. Inner Workings: RNA-based pesticides aim to get around resistance problems / L. Shaffer // *Proceedings National Academy Science USA*. – 2020. – Vol. 117, № 52. – P. 32823-32826.

253. Shahrajabian M. H. Spanish chamomile (*Anacyclus pyrethrum*) and pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*): organic and natural pesticides and treasure of medicinal herbs / M. H. Shahrajabian, W. Sun, Q. Cheng // *Notulae Scientia Biologicae*. – 2021. – Vol. 13, №1. – P. 10816.

254. Sharma A. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem / A. Sharma, V. Kumar, B. Shahzad, M. Tanveer, G. P. S. Sidhu, N. Handa, S. K. Kohli, P. Yadav, A. S. Bali, R. D. Parihar, O. I. Dar, K. Singh, S. Jasrotia, P. Bakshi, M. Ramakrishnan, S. Kumar, R. Bhardwaj, A. K. Thukral // *SN Applied Sciences*. – 2019. – Vol. 1, № 1446. – P. 1-16.
255. Sharma S. Genomic revolution in crop disease diagnosis: a review / S. Sharma, P. Rai, S. Rai, M. Srivastava, P. Kashyap, A. Sharma, S. Kumar // Singh S.S. (ed). *Plants and microbes in an ever-changing environment*. Nova Science Publishers, Hauppauge. – 2017. – P. 257-293
256. Sharma V. K. Antisense oligonucleotides: modifications and clinical trials / V. K. Sharma, R. K. Sharma, S. K. Singh // *Medical Chemical Communications*. – 2014. – Vol. 5. – P. 1454-1471.
257. Siddiqui J. A. Impact of invasive ant species on native fauna across similar habitats under global environmental changes / J. A. Siddiqui, B. S. Bamisile, M. M. Khan, W. Islam, M. Hafeez, I. Bodlah, Y. Xu // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2021. – Vol. 28, № 39. – P. 54362-54382.
258. Siddiqui J. A. Insights into insecticide-resistance mechanisms in invasive species: challenges and control strategies / J. A. Siddiqui, R. Fan, H. Naz, B. S. Bamisile, M. Hafeez, M. I. Ghani, Y. Wei, Y. Xu, X. Chen // *Frontiers in Physiology*. – 2023. – Vol. 13. – P. 1112278.
259. Sioud M. RNA Interference: Story and Mechanisms / M. Sioud // *Methods in Molecular Biology*. – 2021. – Vol. 2282. – P. 1-15.
260. Siuda W. Utilization of selected dissolved organic phosphorus compounds by bacteria in lake water under non-limiting orthophosphate conditions / W. Siuda, R. J. Chróst // *Polish Journal of Environmental Studies*. – 2001. – Vol. 10, № 6. – P. 475-483.
261. Skendžić S. The Impact of Climate Change on Agricultural Insect Pests / S. Skendžić, M. Zovko, I.P. Živković, V. Lešić, D. Lemić // *Insects*. – 2021. – Vol. 12. – P. 440.

262. Sogari G. The future is crawling: evaluating the potential of insects for food and feed security / G. Sogari, M. Amato, R. Palmieri, J. Hadj Saadoun, G. Formici, F. Verneau, S. Mancini // *Current Research in Food Science*. – 2023. – Vol. 6. – P. 100504.
263. South A. Insecticide resistance evolution with mixtures and sequences: a model-based explanation / A. South, I. M. Hastings // *Malaria Journal*. – 2018. – Vol. 17, № 1. – P. 80.
264. Sparks T. C. Insecticide resistance management and industry—The origins and evolution of the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) and the mode of action classification scheme / T. C. Sparks, N. Storer, A. Porter, R. Slater, R. Nauen // *Pest Management Science*. – 2021. – Vol. 77. – P. 2609-2619.
265. Stejskal V. Synthetic and natural insecticides: gas, liquid, gel and solid formulations for stored-product and food-industry pest control / V. Stejskal, T. Vendl, R. Aulicky, C. Athanassiou // *Insects*. – 2021. – Vol. 12, № 7. – P. 590.
266. Subramanyam B. Resistance measurement and management / B. Subramanyam, D. W. Hagstrum // *In Integrated management of insects in stored products*. CRC Press, Boca Raton, Florida. – 2018. – P. 331-397.
267. Sugiura M. Insect spiracle as the main penetration route of pyrethroids / M. Sugiura, Y. Horibe, H. Kawada, M. Takagi // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. – 2008. – Vol. 91, № 3. – P. 135-140.
268. Suhag A. Biotechnological interventions for the sustainable management of a global pest, Whitefly (*Bemisia Tabaci*) / A. Suhag, H. Yadav, D. Chaudhary, S. Subramanian, R. Jaiwal, P.K. Jaiwal // *Insect Science*. – 2020. – Vol. 28. – P. 1228-1252.
269. Sumita Y. Mode of entry of a vaporized pyrethroid knockdown agent into the body of the housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) / Y. Sumita, H. Kawada, N. Minakawa // *Applied Entomology and Zoology*. – 2016. – Vol. 51, № 4. – P. 653-659.
270. Sun K. Active DNA unwinding and transport by a membrane-adapted helicase nanopore / K. Sun, C. Zhao, X. Zeng, Y. Chen, X. Jiang, X. Ding, L. Gou, H.

Xie, X. Li, X. Zhang, S. Lin, L. Dou, L. Wei, H. Niu, M. Zhang, R. Tian, E. Sawyer, Q. Yuan, Y. Huang, P. Chen, C. Zhao, C. Zhou, B. Ying, B. Shi, X. Wei, R. Jiang, L. Zhang, G. Lu, J. Geng // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1-11.

271. Svoboda P. Key mechanistic principles and considerations concerning RNA interference / P. Svoboda // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1237.

272. Szwed J. The Unity, Diversity and Conformity of Bugs (Hemiptera) through time / J. Szwed // *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh*. – 2016. – Vol. 107. – P. 109-128.

273. Tabadkani S. M. Food stress prompts dispersal behavior in apterous pea aphids: do activated aphids incur energy loss? / S. M. Tabadkani, S. M. Ahsaei, V. Hosseiniaveh, J. Nozari // *Physiology & Behavior*. – 2013. – Vol. 110. – P. 221-225.

274. Tabashnik B. E. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres / B. E. Tabashnik, T. Brévault, Y. Carrière // *Nature Biotechnology*. – 2013. – Vol. 31, № 6. – P. 510-521.

275. Tabashnik B. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability / B. Tabashnik, Y. Carrière // *Nature Biotechnology*. – 2017. – Vol. 35, № 10. – P. 926-935.

276. Taning C. N. T. RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market / C. N. T. Taning, S. Arpaia, O. Christiaens, A. Dietz-Pfeilstetter, H. Jones, B. Mezzetti, S. Sabbadini, H. Sorteberg, J. Sweet, V. Ventura, G. Smagghe // *Pest Management Science*. – 2020. – Vol. 76. – P. 841-845.

277. Terenius O. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design / O. Terenius, A. Papanicolaou, J. S. Garbutt, I. Eleftherianos, H. Huvenne, S. Kanginakudru, M. Albrechtsen, C. An, J. L. Aymeric, A. Barthel, P. Bebas, K. Bitra, A. Bravo, F. Chevalier, D. P. Collinge, C. M. Crava, R. A. de Maagd, B. Duvic, M. Erlandson, I. Faye, G. Felföldi, H. Fujiwara, R. Futahashi, A. S. Gandhe, H. S. Gatehouse, L. N. Gatehouse, J. M. Giebultowicz, I. Gómez, C. J. Grimmlikhuijzen, A. T. Groot, F. Hauser, D. G. Heckel, D. D. Hegedus, S. Hrycaj, L. Huang, J. J. Hull, K. Iatrou, M. Iga,

M. R. Kanost, J. Kotwica, C. Li, J. Li, J. Liu, M. Lundmark, S. Matsumoto, M. Meyering-Vos, P. J. Millichap, A. Monteiro, N. Mrinal, T. Niimi, D. Nowara, A. Ohnishi, V. Oostra, K. Ozaki, M. Papakonstantinou, A. Popadic, M. V. Rajam, S. Saenko, R. M. Simpson, M. Soberón, M. R. Strand, S. Tomita, U. Toprak, P. Wang, C. W. Wee, S. Whyard, W. Zhang, J. Nagaraju, R. H. French Constant, S. Herrero, K. Gordon, L. Swevers, G. Smagghe // *Journal of Insect Physiology*. – 2011. – Vol. 57. – P. 231-245.

278. Thompson J. D. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice / J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson // *Nucleic Acids Research*. – 1994. – Vol. 22. – P. 4673-4680.

279. Thorp H. H. The importance of being r: greater oxidative stability of RNA compared with DNA / H. H. Thorp // *Chemical Biology*. – 2000. – Vol. 7, № 2. – P. 33-36.

280. Tien C. J. Accessing the carbofuran degradation ability of Cultures From natural river biofilms in different environments / C. J. Tien, H. J. Huang, C. S. Chen // *CLEAN–Soil, Air, Water*. – 2017. – Vol. 45, № 5. – P. 1-10.

281. Tomari Y. Sorting of Drosophila small silencing RNAs / Y. Tomari, T. Du, P. D. Zamore // *Cell*. – 2007. – Vol. 130, № 2. – P. 299-308.

282. Tomoyasu Y. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in Tribolium / Y. Tomoyasu, S.C. Miller, S. Tomita, M. Schoppmeier, D. Grossmann, G. Bucher // *Genome Biology*. – 2008. – Vol. 9. – P. R10.

283. Tozlu E. The Investigation of the Biological Control of *Icerya purchasi* Maskell, 1878 (Hemiptera: Margarodidae) with Entomopathogenic Fungi and Bacteria / E. Tozlu, N. Tekiner, G. Tozlu, R. Kotan, Ö Çalmaşur, T. Gokturk, F. Dadaşoğlu // *Alinteri Journal of Agriculture Science*. – 2020. – Vol. 35. – P. 50–56.

284. Treiber T. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways / T. Treiber, N. Treiber, G. Meister // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. 5-20.

285. Turner C. T. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding / C. T. Turner, M. W. Davy, R. M. MacDiarmid, K. M. Plummer, N. P. Birch, R. D. Newcomb // *Insect Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 15, № 3. – P. 383-391.

286. Umetsu N. Development of novel pesticides in the 21st century. / N. Umetsu, Y. Shirai // *Journal of Pest Science* – 2020. – Vol. 45, № 2. – P. 54–74.

287. Useinov R. Z. To bee or not to bee: creating DNA insecticides to replace non-selective organophosphate insecticides for use against the soft scale insect *Ceroplastes Japonicus* Green / R. Z. Useinov, N. Gal'chinsky, E. Yatskova, I. Novikov, Y. Puzanova, N. Trikoz, A. Sharmagiy, Y. Plugatar, K. Laikova, V. Oberemok // *Journal of Plant Protection Research*. – 2020. – Vol. 60. – P. 406-409.

288. Valmorbidia I. Association of voltage-gated sodium channel mutations with field-evolved pyrethroid resistant phenotypes in soybean aphid and genetic markers for their detection / I. Valmorbidia, J. D. Hohenstein, B. S. Coates, J. G. Bevilaqua, J. Menger, E. W. Hodgson, R. L. Koch, M. E. O'Neal // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 1-14.

289. Venkatesan T. Insecticide resistance and its management in the insect pests of horticultural crops / T. Venkatesan, B. R. Chethan, M. Mani // *Trends in horticultural entomology*. Springer, Singapore. – 2022. – P. 455-490.

290. Verdonckt T. W. Methods for the Cost-Effective Production of Bacteria-Derived Double-Stranded RNA for *in vitro* Knockdown Studies / T. W. Verdonckt, J. Vanden Broeck // *Frontiers in Physiology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 836106.

291. Vilkhovoy M. The evolution of cell free biomanufacturing / M. Vilkhovoy, A. Adhikari, S. Vadhin, J. D. Varner // *Processes*. – 2020. – Vol. 8. – P. 675.

292. Villanueva R. Sugarcane Aphid: A New Pest of Sorghum / R. Villanueva, M. Brewer, M. Way, S. Biles, D. Sekula-Ortiz, E. Bynum, J. Swart, C. Crumley, A. Knutson, P. Porter // *In Proceedings of the 29th Annual Rio Grande Valley Cotton & Grain Pre-Plant Conference, Edcouch, TX, USA; Texas A&M Agrilife Extension: College Station, TX, USA*. – 2014.

293. Vogel E. RNA Interference in Insects: Protecting Beneficials and Controlling Pests / E. Vogel, D. Santos, L. Mingels, T. Verdonckt, J. V. Broeck // *Frontiers in Physiology*. – 2019. – Vol. 9. – P. 434563.
294. Wang X. W. Insect transmission of plant single-stranded DNA viruses / X. W. Wang, S. Blanc // *Annual Review of Entomology*. – 2021. – Vol. 66. – P. 389-405.
295. Wang Y. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control / Y. Wang, H. Zhang, H. Li, X. Miao // *PLOS One*. – 2011. – Vol. 6, № 4. – P. e18644.
296. Warner J. R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast / J. R. Warner // *Trends in Biochemical Sciences*. – 1999. – Vol. 24. – P. 437-440.
297. Watson G. S. Diversity of cuticular micro and nanostructures on insects: properties, functions, and potential applications / G. S. Watson, J. A. Watson, B. W. Cribb // *Annual Review of Entomology*. – 2017. – Vol. 62. – P. 185-205.
298. Webb J. E. On the penetration of insecticides through the insect cuticle / J. E. Webb, R. A. Green // *The Journal of Experimental Biology*. – 1945. – Vol. 22, № 1. – P. 8-20.
299. Weston D. P. Multiple origins of pyrethroid insecticide resistance across the species complex of a non-target aquatic crustacean, *Hyaella Azteca* / D. P. Weston, H. C. Poynton, G. A. Wellborn, M. J. Lydy, B. J. Blalock, M. S. Sepulveda, J. K. Colbourne // *Proceedings National Academy Science USA*. – 2013. – Vol. 110. – P. 16532-16537.
300. Whangbo J. S. Environmental RNA interference / J. S. Whangbo, C. P. Hunter // *Trends in Genetics*. – 2008. – Vol. 24. – P. 297-305.
301. Willow J. Examining spray-induced gene silencing for pollen beetle control / J. Willow, T. Kallavus, L. Soonvald, F. Caby, A. I. Silva, S. Sulg // *Journal of Natural Pesticide Research*. – 2023. – Vol. 5. – P. 100036.
302. Willow J. Uniting RNAi technology and conservation biocontrol to promote global food security and agrobiodiversity / J. Willow, S. M. Cook, E. Veromann, G. Smaghe // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2022. – Vol. 10. – P. 871651.

303. Winston W. M. *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference / W. M. Winston, M. Sutherlin, A. J. Wright, E. H. Feinberg, C. P. Hunter // *Proceedings National Academy Science USA*. – 2007. – Vol. 104. – P. 10565-10570.

304. Wu W. Roles of bacterial symbionts in transmission of plant virus by hemipteran vectors / W. Wu, H. W. Shan, J. M. Li, C. X. Zhang, J. P. Chen, Q. Mao // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 805352.

305. Xiao D. Clathrin-dependent endocytosis plays a predominant role in cellular uptake of double-stranded RNA in the red four beetle / D. Xiao, X. Gao, J. Xu, X. Liang, Q. Li, J. Yao, K. Y. Zhu // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 60. – P. 68-77.

306. Xu H. J. Genome-wide screening for components of small interfering RNA (siRNA) and micro-RNA (miRNA) pathways in the brown plant hopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) / H. J. Xu, T. Chen, X. F. Ma, J. Xue, P. L. Pan, X. C. Zhang, J. A. Cheng, C. X. Zhang // *Insect Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 22. – P. 635-647.

307. Xu J. RNA interference in moths: mechanisms, applications, and progress / J. Xu, X. F. Wang, P. Chen, F. T. Liu, S. C. Zheng, H. Ye, M. H. Mo // *Genes*. – 2016. – Vol. 7, № 10 – P. 88.

308. Xu, Q. CRISPR/Cas Technology in Insect Insecticide Resistance / Q. Xu, M. Wang, J. Zeng, H. Sun, X. Wei, H. Jiang, X. Shentu, D. Sun // *Insects*. – 2025. – Vol. 16. – P. 345.

309. Yang W. Nucleases: diversity of structure, function and mechanism / W. Yang // *Quarterly Reviews of Biophysics*. – 2011. – Vol. 44, № 1. – P. 1-93.

310. Yoon K. J. One genome, multiple phenotypes: decoding the evolution and mechanisms of environmentally induced developmental plasticity in insects / K. J. Yoon, C. B. Cunningham, A. Bretman, E. J. Duncan // *Biochemical Society Transactions*. – 2023. – Vol. 51, № 2. – P. 675-689.

311. Yoshiyama N. A survey of the effectiveness of non-cell autonomous RNAi throughout development in the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera) / N. Yoshiyama,

K. Tojo, M. Hatakeyama // *Journal of Insect Physiology*. – 2013. – Vol. 59. – P. 400–407.

312. You L. L. Driving pest insect populations: agricultural chemicals lead to an adaptive syndrome in *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae) / L. L. You, Y. Wu, B. Xu, J. Ding, L. Q. Ge, G. Q. Yang, Q. S. Song, D. Stanley, J. C. Wu // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6, № 37430. – P. 1-10.

313. Yu N. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions / N. Yu, O. Christiaens, J. Liu, J. Niu, K. Cappelle, S. Caccia, H. Huvenne, G. Smagghe // *Insect Science*. – 2012. – Vol. 20, № 1. – P. 4-14.

314. Zaitsev A. S. Influence of DNA oligonucleotides used as insecticides on biochemical parameters of *Quercus robur* and *Malus domestica* / A. S. Zaitsev, O. V. Omelchenko, P. M. Nyadar, V. V. Oberemok // *Bulletin of the Transilvania University of Brasov. Series II: Forestry, Wood Industry, Agricultural Food Engineering*. – 2015. – Vol. 8. – P. 37-46.

315. Zhang H. Lepidopteran insect species-specific, broad-spectrum, and systemic RNA interference by spraying dsRNA on larvae / H. Zhang, H. Li, R. Guan, X. Miao // *Entomologia Experimentalis et Applicata*. – 2015. – Vol. 155, № 3. – P. 218-228.

316. Zhang Y. Salivary Effector Sm9723 of Grain Aphid *Sitobion miscanthi* Suppresses Plant Defense and Is Essential for Aphid Survival on Wheat / Y. Zhang, X. Liu, Y. Fu, L. Crespo-Herrera, H. Liu, Q. Wang, Y. Zhang, J. Chen // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, № 13. – P. 6909.

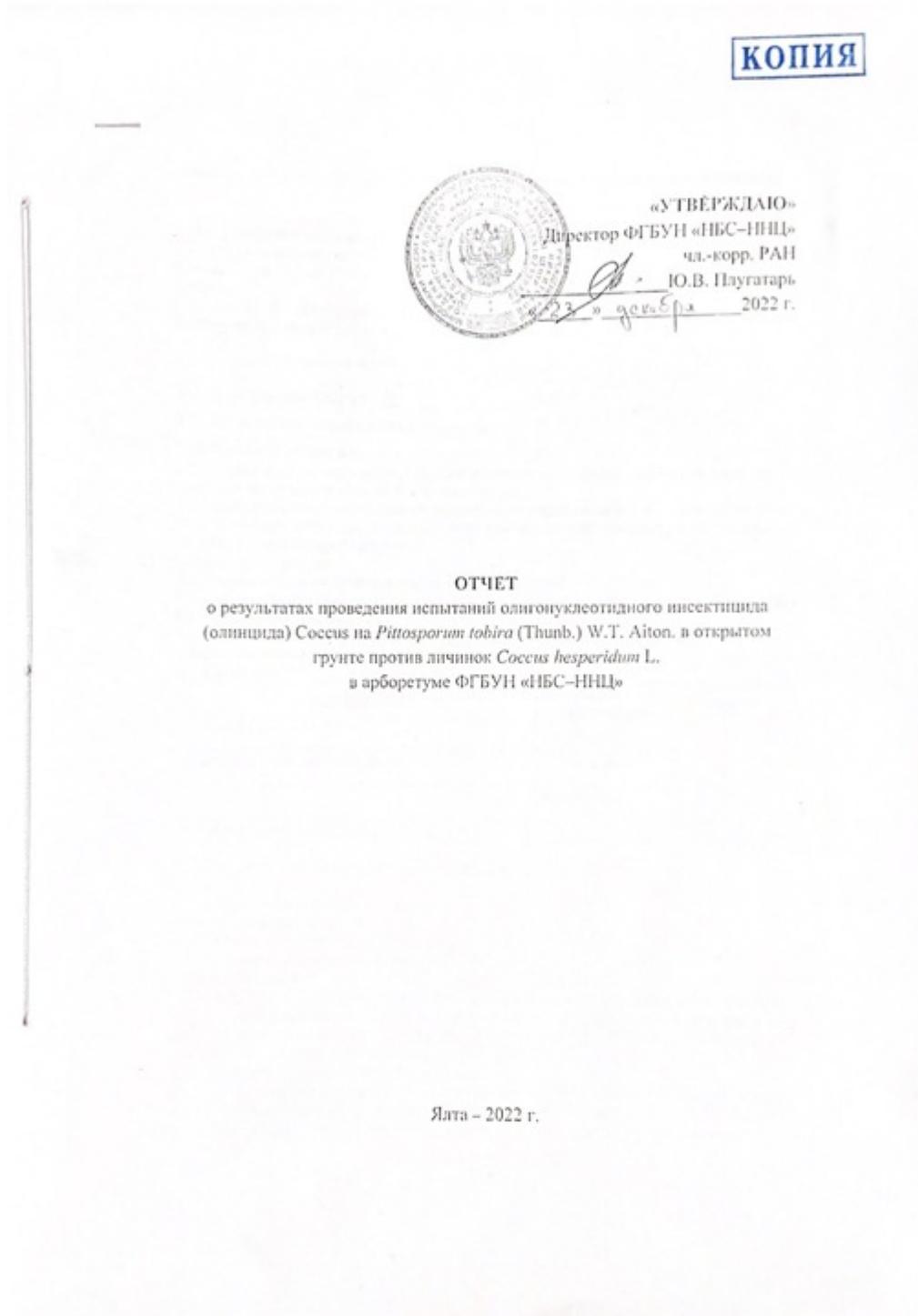
317. Zhang Z. A greedy algorithm for aligning DNA sequences / Z. Zhang, S. Schwartz, L. Wagner, W. Miller // *Journal of Computational Biology*. – 2000. – Vol. 7. – P. 203-214.

318. Zhao J. H. Development of lady beetle attractants from floral volatiles and other semi chemicals for the biological control of aphids / J. H. Zhao, Z. Y. Wang, Z. S. Li, J. Y. Shi, L. Meng, G. R. Wang, J. L. Cheng, Y. J. Du // *Journal of Asia-Pacific Entomology*. – 2020. – Vol. 23. – P. 1023-1029.

319. Zheng Y. A polymer detergent formulation improves dsRNA penetration through the body wall and RNAi-induced mortality in the soybean aphid *Aphis glycines* / Y. Zheng, Y. Hu, S. Yan, H. Zhou, D. Song, M. Yin, J. Shen // *Pest Management Science*. – 2019. – Vol. 75, № 7. – P.1993-1999.
320. Zhu F. Insecticide resistance and management strategies in urban ecosystems / F. Zhu, L. Lavine, S. O’Neal, M. Lavine, C. Foss, D. Walsh // *Insects*. – 2016. – Vol. 7. – P. 2.
321. Zhu K. Y. Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNAInterference / K. Y. Zhu, S. R. Palli // *Annual Review of Entomology*. – 2020.– Vol. 65. – P. 293-311.
322. Zotti M. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes / M. Zotti, E.A. Dos Santos, D. Cagliari, O. Christiaens, C. N. T. Taning, G. Smagghe // *Pest Management Science*. – 2018. – Vol. 74. – P. 1239-1250.
323. Zou X. M. Effects of soil acidification on the toxicity of organophosphorus pesticide on *Eisenia fetida* and its mechanism / X. M. Zou, X. Y. Xiao, H. F. Zhou, F. Chen, J. J. Zeng, W. B. Wang, G. P. Feng, X. F. Huang // *Journal of Hazardous Materials*. – 2018. – Vol. 359. – P. 365-372.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А. Отчёт о результатах проведения испытаний олигонуклеотидного инсектицида в открытом грунте против личинок *Coccus hesperidum* L. в ФГБУН «НБС-ННЦ» в 2020 году.



Продолжение приложения А

Отчёт по испытанию эффективности олигоуказециданого инсектицида (олицида)
против *Coccis hesperidum* L.

1. Период проведения опыта: вегетационный период 2020 г.
2. Место проведения опыта: ФГБУН «НБС-НИИ».
3. Фаза развития вредного объекта на момент проведения испытаний: самки, яйца и личинки;
4. Культура: *Pittosporum tobira* (Thunb.) W.T. Aiton.;
5. Метеорологические данные:
 - 5.1. День проведения обработки: 27.05
 - 5.1.1. Температура воздуха, °C: 15,4
 - 5.1.2. Относительная влажность воздуха, %: 75
 - 5.1.3. Скорость ветра, м/с: 2-5
 - 5.1.4. Время выпадения осадков: после обработки на 2-е сутки – 8,8 мм; на 3-и сутки – 7,5 мм, на 4-е сутки – 7,6 мм, на 5-е сутки – 1,0 мм.
- 5.2. Экстремальные метеословия низкие температуры в марте и апреле привели к задержке начала вегетации, а в июне и июле при повышении температур способствовали увеличению численности вредителей.
6. Проведение опыта:
 - 6.1. Размер деленок и их размещение: мелкоделеночный
 - 6.2. Количество повторностей: 4
 - 6.3. Срок обработки: 04.07.22
 - 6.4. Способ применения препарата: опрыскивание вегетирующих растений
 - 6.5. Используемая аппаратура: опрыскиватель ручной емк. 1 л.
 - 6.6. Схема опыта

Варианты опыта	Нормы применения	Кратность
Coccis 11	1 л/ 10 л H ₂ O	1
Произвольный олицид (Проф)	1 л/ 10 л H ₂ O	1
Актара	8гр/10л H ₂ O	1
Контроль (без обработки)	-	-

27.05.20. мягкая дождепитовка *Coccis hesperidum* L.

7. Учеты:

7.1. Даты учетов вредных объектов:

27.05.20 – перед обработкой;

10.06.20 – на 14-е сутки после обработки;

7.2. Дата появления вредных объектов

Третья декада мая

7.3. Методика проведения учетов: учёт проводили согласно «Методическим указаниям по регистрационным испытаниям инсектицидов, акарицидов, моллюскоцидов и родентицидов в сельском хозяйстве», Санкт-Петербург, 2009 г., биологическую эффективность определяли по формуле Аббота (стр. 29).

8. Обезудение результатов опыта: таблица 1

В конце апреля самки приступают к яйскладке. Личинки *Coccis hesperidum* на ЮБК зафиксированы в третьей декаде мая при среднесуточной температуре 15,0 °C. Развитие вредителя перед обработкой было одинаковым на всех участках Биологической

Продолжение приложения А

эффективность опытных инсектицидов в норме применения 1,0 г/10л H₂O составила 95 %.

Таблица 1
Биологическая эффективность олинцида Соссиус 11 (1 г/10л) в борьбе с мягкой ложной цитовой (Cossus hesperidum) на пштенспоруме тобира открытого грунта

Вариант опыта	Норма применения препарата, л/га	Повторность	Среднее количество личинок, экз.		Биологическая эффективность, %
			До обработки	после обработки по суткам учета	
Соссиус 11	1 мл/10 л воды	1	300	15	95,0
		2	300	10	96,67
		3	300	21	93,0
		4	300	14	95,33
		ср.	300,0	15	95,0
Противосный олинцид (Проф)	1 мл/10 л воды	1	300	264	12,0
		2	300	283	5,67
		3	300	297	1,0
		4	300	281	6,33
		ср.	300,0	281,25	6,25
Актара	8 г/10л H ₂ O	1	300	51	83,0
		2	300	55	81,67
		3	300	42	86,0
		4	300	30	90,0
		ср.	300,0	44,5	85,16
Контроль	-	1	300	324	-
		2	300	321	-
		3	300	307	-
		4	300	300	-
		ср.	300	313	-

9. Выводы

Биологическая эффективность олинцида Соссиус 11 на 14-е сутки составила 95,0 %.

Зав. лабораторией энтомологии и фитопатологии ФГБУН «НЕС-ИИЦ»,
с.н.с., к. б. н.

Г. н. с., д. с.-х.н.

С.н.с., д.б.н.

М. н. с.

Шармагый А.К.
Балькина Е.Б.
Оберемок В.В.
Яикова Е.В.

Шармагый А.К.

Балькина Е.Б.

Оберемок В.В.

Яикова Е.В.

Приложение Б. Отчёт о результатах проведения испытаний олигонуклеотидных инсектицидов в открытом грунте против *Trioza alacris* Flor. в ФГБУН «НБС-ННЦ» в 2021 году.

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУН «НБС-ННЦ»

академик РАН, профессор

Ю.В. Плугатарь

_____ 2025 г.



ОТЧЕТ

о результатах проведения испытаний олигонуклеотидных инсектицидов (олинцидов) LAURA-11 (5'-GAC-ACG-CGC-GC-3') и ALACRIS-11 (5'-CCA-CCG-GGT-AG -3') на *Laurus nobilis* L. в открытом грунте против *Trioza alacris* Flor. в арборетуме ФГБУН «НБС-ННЦ».

Ялта – 2025 г.

Продолжение приложения Б

Согласно теме № 0829-2019-0025 «Разработать теоретические основы и комплексные экологически щадящие методы регулирования численности и вредоносности патогенов и вредителей для обеспечения биобезопасности садово-парковых фитоценозов Крыма и юга России».

Этап 2021 года «Разработка прогноза развития вредных организмов и методов стабилизации многолетних агроэкосистем, основанных на выявленных закономерностях формирования и функционирования энтомо-микопатогенного комплекса на основе подбора устойчивых к патогенам видов и сортов растений и применения биологических и биотехнических методов регулирования процессов жизнедеятельности экономически значимых видов» (заключительный) были проведены испытания эффективности олигонуклеотидного инсектицида (олинцида) *Trioza alacris* Flor.

1. Период проведения опыта: вегетационный период 2021 г.

2. Место проведения опыта: ФГБУН «НБС-ННЦ».

3. Фаза развития вредного объекта на момент проведения испытаний: личинки;

4. Культура: лавр благородный (*Laurus nobilis* L.);

5. Метеорологические данные:

5.1. В день проведения обработки: 13.08

5.1.1. Температура воздуха, °С: 24,7

5.1.2. Относительная влажность воздуха, %: 46

5.1.3. Скорость ветра, м/с: 3-5

5.1.4. Время выпадения осадков: -.

6. Проведение опыта:

6.1. Размер делянок и их размещение: мелкоделяночный (площадь участка 10 м², на котором произрастает 12 – 20 растений лавра благородного высотой до 2 м).

6.2. Количество повторностей: 4

6.3. Срок обработки: 13.08.2021

6.4. Способ применения препарата: опрыскивание вегетирующих растений

6.5. Используемая аппаратура: опрыскиватель ручной емк. 1 л.

6.6. Схема опыта

Варианты опыта	Нормы применения	Кратность
LAURA-11 5'-GAC-ACG-CGC-GC-3'	1 г/10л H ₂ O	1
ALACRIS-11 5'-CCA-CCG-GGT-AG -3'	1 г/10л H ₂ O	
ACGT 5'-ACT-TAC-GTA-CG-3'	1 г/10л H ₂ O	1

Продолжение приложения Б

Контроль (без обработки)	-	-
--------------------------	---	---

13.08.2021, личинки лавровой листоблошки *Trioza alacris* Flor.

7. Учеты:

7.1. Даты учетов вредных объектов:

13.08.2021 – перед обработкой;

27.08.2021 – на 14-е сутки после обработки;

7.2. Дата появления вредных объектов

Зимуют имаго лавровой листоблошки *Trioza alacris* Flor., в зоне корневой шейки. Весной, с распусканием молодых листьев, листоблошка переселяется в крону и начинает откладывать яйца на листья. Отродившиеся личинки первого поколения питаются на молодом приросте, образуя галлы разных размеров, внутри которых находятся личинки и нимфы, покрытые белыми восковыми выделениями. Развитие личинок проходит быстро и уже в первой декаде июня появляются взрослые листоблошки, которые встречаются до конца июня. В этот период начинается яйцекладка второго поколения, в течение июля проходит отрождение личинок и появляются взрослые особи. В году развивается две генерации, которые накладываются друг на друга, поэтому в течение сезона можно встретить все стадии онтогенеза

7.3. Методика проведения учетов: Учёты проводили согласно: «Методическим указаниям по регистрационным испытаниям инсектицидов, акарицидов, молоскоцидов и родентицидов в сельском хозяйстве», С.-П. 2009 г. стр. 321, биологическую эффективность определяли по формуле Аббота (стр. 29-30).

8. Обсуждение результатов опыта: таблица 1

Развитие вредителя перед обработкой было одинаковым на всех участках. Биологическая эффективность опытных инсектицидов LAURA-11 5'-GAC-ACG-CGC-GC-3' в норме применения 1 г/10л H₂O составляла 66,0%, и ALACRIS-11 5'-CCA-CCG-GGT-AG -3' в норме применения 1 г/10л H₂O составляла 97,0%.

Таблица 1

Гибель предимагинальных стадий *Trioza alacris* Flor. после применения одноцепочных ДНК-инсектицидов LAURA, ACGT и ALACRIS. ФГБУН «НБС-ННЦ», 2021 г.

Вариант опыта	Норма применения	Среднее число личинок на 25 молодых листьях экз.		Снижение численности относительно исходной с поправкой на контроль на 20 сутки после обраб. %
		До Обработки, ср	20 сутки после обраб, ср	
LAURA	1 мл. / 10 л.	100	34	66
ALACRIS	1 мл. / 10 л.	100	3	97

Продолжение приложения Б

АСГТ	1 мл. / 10 л.	100	61	-
Контроль	-	100	69	-

9. Выводы

Биологическая эффективность инсектицида LAURA-11 5'-GAC-ACG-CGC-GC-3 была на 14-е сутки 66%, ALACRIS-11 5'-CCA-CCG-GGT-AG -3- 97,0% .

Зав. отделом дендрологии, цветоводства
и ландшафтной архитектуры, ФГБУН «НБС-ННЦ»,
с.н.с., к.б.н.

Зав лабораторией энтомологии и
фитопатологии ФГБУН «НБС-ННЦ»,
Г.н.с., д.с-х.н.

С.н.с., д.б.н.

Н.с.

 Шармагий А.К.

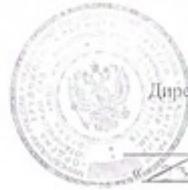
 Балькина Е.Б.

Оберемок В.В.

 Яцкова Е.В.

Приложение В. Отчёт о результатах проведения испытаний олигонуклеотидного инсектицида в открытом грунте против *Dynaspidiotus britannicus* Newstead в ФГБУН «НБС-ННЦ» в 2022 году.

КОПИЯ



«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ФГБУН «НБС-ННЦ»
чл.-корр. РАН
Ю.В. Плугатарь
_____ 2022 г.

ОТЧЕТ

о результатах проведения испытаний олигонуклеотидного инсектицида (олиинцида) Дупазр на *Laurus nobilis* L. в открытом грунте против *Dynaspidiotus britannicus* Newstead в арборетуме ФГБУН «НБС-ННЦ»

Ялта - 2022 г.

Продолжение приложения В

Отчёт по испытанию эффективности олигоулицеотидного инсектицида (олигинида)
Дунаспр против *Dunaspidotus britannicus* Newstead

1. Период проведения опыта: вегетационный период 2022 г.
2. Место проведения опыта: ФГБУН «ИВС-НИИ».
3. Фаза развития вредного объекта на момент проведения испытаний: личинки;
4. Культура: лар благородный;
5. Метеорологические данные.

5.1. В день проведения обработки: 26.04

5.1.1. Температура воздуха, °С: 17,0

5.1.2. Относительная влажность воздуха, %: 48

5.1.3. Скорость ветра, м/с: 3-5

5.1.4. Время выпадения осадков: после 1-ой обработки на 5-е сутки – 0,4 мм; на 8-е сутки – 0,1 мм; на 9-е сутки – 4,6 мм; на 10-е сутки – 1,6 мм.

6. Проведение опыта:

6.1. Размер делянок и их размещение: мелкоделяночный

6.2. Количество повторностей: 4

6.3. Срок обработки: 26.04.2022

6.4. Способ применения препарата: опрыскивание вегетирующих растений

6.5. Используемая аппаратура: опрыскиватель ручной емк. 1 л.

6.6. Схема опыта

Варианты опыта	Нормы применения	Кратность
Дунаспр	1 г / 10 л H ₂ O	1
ДунаспR	1 г / 10 л H ₂ O	1
ДунаспL	1 г / 10 л H ₂ O	1
ДунаспM	1 г / 10 л H ₂ O	1
Актара ВДГ	10 г / 10 л H ₂ O	1
Контроль (без обработки)	-	-

26.04.22, британская шитовка *Dunaspidotus britannicus* Newstead

7. Учеты

7.1. Дата учетов вредных объектов:

26.04.22 – перед обработкой;

10.05.22 – на 14-е сутки после обработки;

7.2. Дата появления вредных объектов

Зимует британская шитовка *Dunaspidotus britannicus* на втором личиночном возрасте, превращение в имаго начинается в первой декаде мая при среднесуточной температуре в течение 10-15 суток выше 10 °С.

7.3. Методика проведения учетов: учёты проводили согласно «Методическим указаниям по регистрационным испытаниям инсектицидов, акарицидов, моллюскоцидов и роenticидов в сельском хозяйстве», Санкт-Петербурге, 2009 г., биологическую эффективность определяли по формуле Аббота (стр. 29).

8. Обсуждение результатов опыта: таблица 1

В конце апреля питаются личинки *Dunaspidotus britannicus* на ларе благородном открытого грунта на ЮБК, отмечены самки с первой декады мая при среднесуточной

Продолжение проложения В

температуре 10,0 °С. Развитие вредителя перед обработкой было одинаковым на всех участках. После обработки развитие вредителя не прекратилось ни в опыте, ни в контроле. Биологическая эффективность опытных инсектицидов в норме применения 1,0 г/10л H₂O составляла 64,83% (Дунаэр), в эталоне (Актара ВДГ) – 80,58%.

Таблица 1
Биологическая эффективность олинцида Дунаэр (1 г/10л) в борьбе с британской щитовкой (*Duaspriolotus britannicus*) на лавре благородном открытого грунта

Вариант Опыта	Норма применения препа- рата, 100 л/га	Повторность	Среднее количество личинок, экз.		Биологическая эффективность, %
			до обработки	после обработки на сутки учета	
Дунаэр	1 г/10 л воды	1	300	114	62
		2	300	72	76
		3	300	119	60,33
		4	300	117	61
		ср.	300,0	105,50	64,83
ДунаэрL	1 г/10 л воды	1	300	191	36,33
		2	300	123	59
		3	300	193	35,67
		4	300	194	35,33
		ср.	300,0	175,25	41,58
ДунаэрR	1 г/10 л воды	1	300	157	47,67
		2	300	148	50,67
		3	300	152	49,33
		4	300	149	50,33
		ср.	300,0	151,5	49,5
ДунаэрM	1 г/10 л воды	1	300	211	29,67
		2	300	212	29,33
		3	300	209	30,33
		4	300	211	29,67
		ср.	300,0	210,75	29,75
Актара ВДГ (эталон)	10 г/10 л воды	1	300	57	81,0
		2	300	57	81,0
		3	300	58	80,67
		4	300	61	79,67
		ср.	300	58,25	80,58
Контроль	-	1	300	300	-
		2	300	300	-
		3	300	300	-
		4	300	300	-
		ср.	300	300	-

9. Выводы

Биологическая эффективность инсектицида Дунаэр составила на 14-е сутки 64,83%.

Зав. лабораторией энтомологии и
фитопатологии ФГБУН «НВС-НИЦ»,
с.н.с., к. б. н.

Г. н. с., д. с-х.н.

С.н.с., д.б.н.

М. н. с.

Шармагия А.К.
Балькина Е.Б.
Обермокс В.В.
Яцкова Е.В.

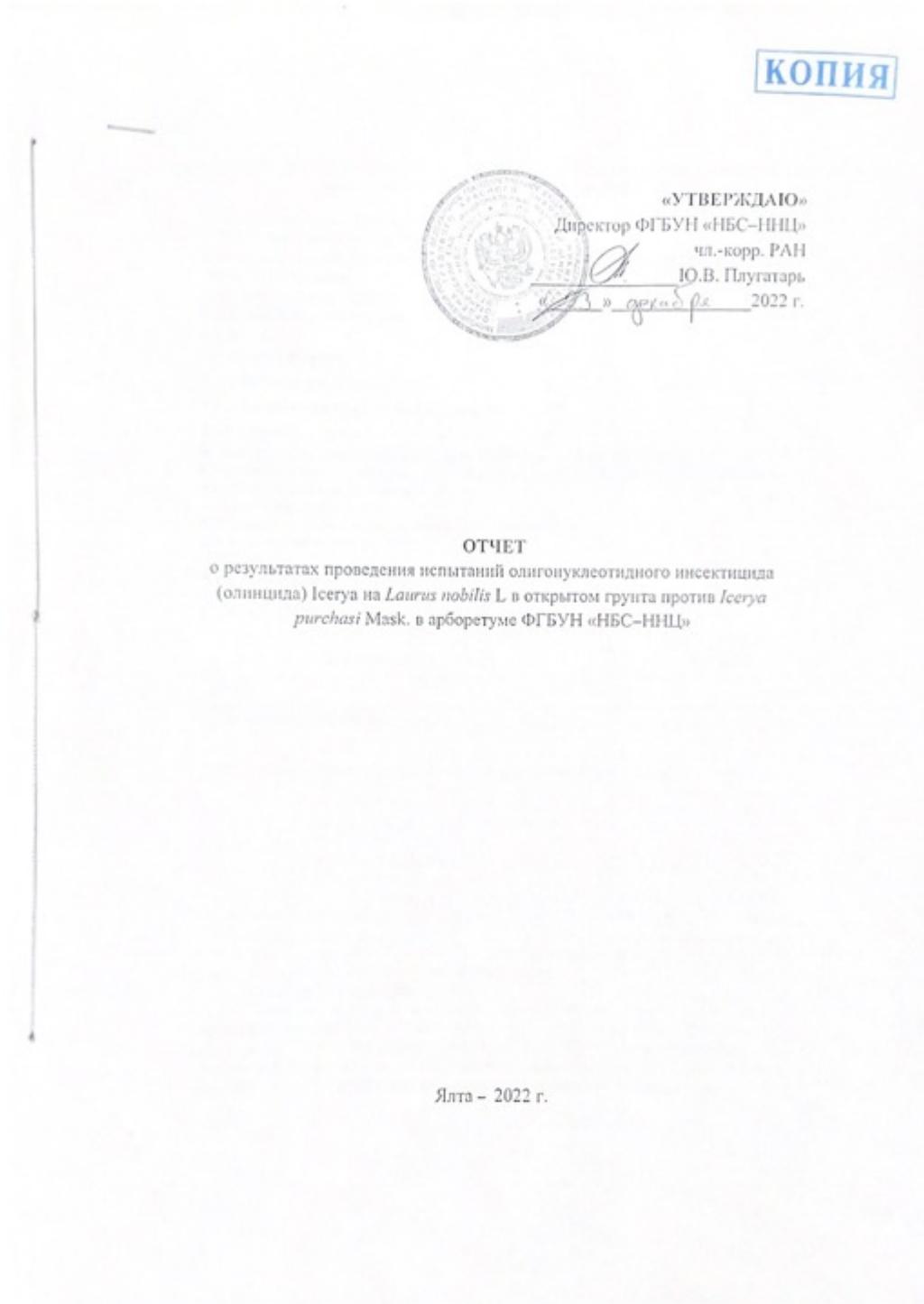
Шармагия А.К.

Балькина Е.Б.

Обермокс В.В.

Яцкова Е.В.

Приложение Г. Отчёт о результатах проведения испытаний олигонуклеотидного инсектицида в открытом грунте против *Icerya purchasi* Mask. в ФГБУН «НБС-ННЦ» в 2022 году.



Продолжение приложения Г

Отчёт по испытанию эффективности одитовульфотидного инсектицида (олигинида) Isegya против самок и личинок *Icerya purchasi* Mask.

1. Период проведения опыта: равновесный 2022 г.
2. Место проведения опыта: ФГБУН «НБС-НИЦ».
3. Фаза развития вредного объекта на момент проведения испытаний: самки и личинки 3-го возраста;
4. Культура: *Laurus nobilis* L;
5. Метеорологические данные.
 - 5.1. В день проведения обработки: 26.02
 - 5.1.1. Температура воздуха, °C: 6,5
 - 5.1.2. Относительная влажность воздуха, %: 100
 - 5.1.3. Скорость ветра, м/с: 3-6
 - 5.1.4. Время выпадения осадков: в день обработки – 1,8 мм, на 1-е сутки – 0,1 мм.; на 2-е сутки – 6,2 мм; на 3-и сутки – 25,4 мм; на 4-е сутки – 1,6 мм; на 8-е сутки – 0,3 мм; на 9-е сутки – 3,4 мм; на 10-е сутки – 1,4 мм.
6. Проведение опыта:
 - 6.1. Размер деленок и их размещение: мелкоделяночный
 - 6.2. Количество повторностей: 4
 - 6.3. Срок обработки: 26.02.2022
 - 6.4. Способ применения препарата: опрыскивание растений
 - 6.5. Используемая аппаратура: опрыскиватель ручной емк. 1 л.
 - 6.6. Схема опыта

Варианты опыта	Нормы применения	Кратность
Isegya	1 г / 10 л H ₂ O	1
Контроль (без обработки)	–	–

26.02.22, австралийский желобчатый червец *Icerya purchasi* Mask. – на лавре благородном

7. Учеты:
 - 7.1. Даты учетов вредных объектов: 26.02.22 – перед обработкой; 14.03.22 – на 14-е сутки после обработки.
 - 7.2. Дата появления вредных объектов
 - В январе-феврале отмечено развитие самок с овисками и личинок старших возрастов.
 - 7.3. Методика проведения учетов: учеты проводили согласно «Методическим указаниям по регистрационным испытаниям инсектицидов, акарицидов, моллюскоцидов и родентицидов в сельском хозяйстве», Санкт-Петербург, 2009 г, биологическую эффективность определяли по формуле Аббота (стр. 29).
 8. Обсуждение результатов опыта: таблица 1
- Зимуют самки с овисками и молодые самки, первые личинки австралийского желобчатого червца *Icerya purchasi* Mask. открытого грунта на ЮБК зафиксированы в первой декаде июня при среднесуточной температуре 26,1 °С. Развитие вредителя перед обработкой было одинаковым на всех участках. После обработки развитие вредителя не прекратилось ни в опыте, ни в контроле. Биологическая эффективность опытных

Продолжение приложения Г

инсектицидов в норме применения 1 г/10 л H₂O составила 61,31 %.

Таблица 1

Биологическая эффективность ДНК инсектицидов (1 г/10л) в борьбе с австралийским желобчатым червцом (*Icerya purchasi* Mask.) на лавре благородном открытом грунте.

Вариант опыта	Норма применения препарата, 100 л/га	Повторность	Среднее количество имаго, экз.		Биологическая эффективность, %
			До обработки	после обработки по суткам учетов	
Icerya	1 г/10 л воды	1	105	40	61,90
		2	108	43	60,18
		3	96	34	64,58
		4	102	42	58,82
		ср.	102,75	39,75	61,31
Контроль	-	1	105	105	-
		2	108	108	-
		3	96	97	-
		4	102	105	-
		ср.	102,75	103,75	-

9. Выводы

Биологическая эффективность олигицида Icerya составила на 14-е сутки 61,31 %.

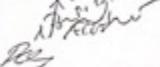
Зав. лабораторией энтомологии и фитопатологии ФГБУН «НБС-НИЦ»,
с.н.с., к.б.н.

Г.н.с., д.с.-х.н.

С.н.с., д.б.н.

М.н.с.


Шармагий А.К.

Балькина Е.Б.

Оберемок В.В.

Яшкова Е.В.

Приложение Д. Результаты секвенирования фрагмента гена 28S рРНК мягкой ложнощитовки *Coccus hesperidum* L. (обнаруженной в ФГБУН «НБС-НИЦ»).

Coccus hesperidum voucher NBG:06 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OR889423.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

```

LOCUS      OR889423                86 bp    DNA     linear   INV 09-DEC-2023
DEFINITION Coccus hesperidum voucher NBG:06 large subunit ribosomal RNA gene,
           partial sequence.
ACCESSION  OR889423
VERSION    OR889423.1
KEYWORDS   .
SOURCE     Coccus hesperidum
  ORGANISM Coccus hesperidum
           Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;
           Pterygota; Neoptera; Paraneoptera; Hemiptera; Sternorrhyncha;
           Coccoidea; Coccidae; Coccus.
REFERENCE  1 (bases 1 to 86)
  AUTHORS  Gal'chinsky,N.V. and Oberemok,V.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (04-DEC-2023) Department of Molecular Genetics and
           Biotechnologies, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, 4
           Vernadskogo Avenue, Simferopol, Crimea 295007, Russia
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
           Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
           ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
  source   1..86
           /organism="Coccus hesperidum"
           /mol_type="genomic DNA"
           /specimen_voucher="NBG:06"
           /db_xref="taxon:538890"
           /geo_loc_name="Russia"
           /collection_date="25-Dec-2020"
  rRNA   <1..>86
           /product="large subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
  1 cgctggtacc cgaagatgg tgaactatgc ctggccagga tgaagtcagg gaaaccctg
  61 atggagggtcc gcagcgattc tgacgt
//

```

Рисунок 1. Последовательность из 86 нуклеотидов загружена в систему GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) под номером OR889423.1

Приложение Е. Результаты секвенирования фрагмента гена 28S рРНК японской восковой ложнощитовки *Ceroplastes japonicus* Green (обнаруженной в ФГБУН «НБС-НИЦ»).

Ceroplastes japonicus voucher NBG:04 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OR852411.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

```

LOCUS       OR852411                127 bp    DNA     linear   INV 29-NOV-2023
DEFINITION Ceroplastes japonicus voucher NBG:04 large subunit ribosomal RNA
            gene, partial sequence.
ACCESSION   OR852411
VERSION     OR852411.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Ceroplastes japonicus
  ORGANISM  Ceroplastes japonicus
            Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;
            Pterygota; Neoptera; Paraneoptera; Hemiptera; Sternorrhyncha;
            Coccoidea; Coccidae; Ceroplastes.
REFERENCE   1 (bases 1 to 127)
  AUTHORS   Gal'chinsky,N.V. and Oberemok,V.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (23-NOV-2023) Department of Molecular Genetics and
            Biotechnologies, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, 4
            Vernadskogo Avenue, Simferopol, Crimea 295007, Russia
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
   source             1..127
                     /organism="Ceroplastes japonicus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /specimen_voucher="NBG:04"
                     /db_xref="taxon:1182649"
                     /geo_loc_name="Russia"
                     /collection_date="25-Dec-2020"
   rRNA             <1..>127
                     /product="large subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
  1 gacgggcgga gcgcgttcgc gcgcgttcgt cggtcgattc gatatttccg ccgccgatct
  61 ccaccgaggg tgtcggacgt cgcgaccctg tcgccacgag tcgatgctga gggacgcggt
  121 ttcagtt
//

```

Рисунок 1. Последовательность из 127 нуклеотидов загружена в систему GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) под номером OR852411.1

Приложение Ё. Результаты секвенирования фрагмента гена 28S рРНК австралийского желобчатого червеца *Icerya purchasi* Mask. (обнаруженного в ФГБУН «НБС-НИЦ»).

Icerya purchasi voucher NBG:02 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OR852410.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS OR852410 182 bp DNA linear INV 29-NOV-2023
 DEFINITION *Icerya purchasi* voucher NBG:02 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION OR852410
 VERSION OR852410.1
 KEYWORDS .
 SOURCE *Icerya purchasi*
 ORGANISM [Icerya purchasi](#)
 Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Paraneoptera; Hemiptera; Sternorrhyncha; Coccoidea; Monophlebidae; *Icerya*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 182)
 AUTHORS Gal'chinsky,N.V., Yatskova,E.V., Novikov,I.A., Useinov,R.Z., Kouakou,N.J., Kouame,K.F., Kra,K.D., Sharmagiy,A.K., Plugatar,Y.V., Laikova,K.V. and Oberemok,V.V.
 TITLE *Icerya purchasi* Maskell (Hemiptera: Monophlebidae) Control Using Low Carbon Footprint Oligonucleotide Insecticides
 JOURNAL Int J Mol Sci 24 (14), 11650 (2023)
 PUBMED [37511407](#)
 REMARK Publication Status: Online-Only
 REFERENCE 2 (bases 1 to 182)
 AUTHORS Gal'chinsky,N.V. and Oberemok,V.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (23-NOV-2023) Department of Molecular Genetics and Biotechnologies, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, 4 Vernadskogo Avenue, Simferopol, Crimea 295007, Russia
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..182
 /organism="Icerya purchasi"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="NBG:02"
 /db_xref="taxon:249532"
 /geo_loc_name="Russia"
 /collection_date="25-Dec-2020"
 rRNA
 <1..>182
 /product="large subunit ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gacgttcgtc ttatcgccgg tgaataccac tactcgcac gtttccttac ttactcggtt
 61 atgcggagcg cgtgctggtt ggtcctggtc ttggccggt gccgttttgt acgtactcgg
 121 tcgtcgggtg ttcgtgggct ggtaaaccgc gtcggggtta tcgttcaagt tgtgcacttg
 181 ca
 //

Рисунок 1. Последовательность из 182 нуклеотидов загружена в систему GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) под номером OR852410.1

Приложение Ж. Результаты секвенирования фрагмента гена 28S рРНК лавровой щитовки *Aonidia lauri* Bouche (обнаруженной в ФГБУН «НБС-ННЦ»).

Aonidia lauri voucher NBG:03 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OR852409.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

```

LOCUS       OR852409                108 bp    DNA     linear   INV 19-JAN-2024
DEFINITION  Aonidia lauri voucher NBG:03 large subunit ribosomal RNA gene,
             partial sequence.
ACCESSION   OR852409
VERSION     OR852409.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aonidia lauri
  ORGANISM  Aonidia lauri
            Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;
            Pterygota; Neoptera; Paraneoptera; Hemiptera; Sternorrhyncha;
            Coccoidea; Diaspididae; Aonidia.
REFERENCE   1 (bases 1 to 108)
  AUTHORS   Gal'chinsky,N.V., Yatskova,E.V., Novikov,I.A., Sharmagiy,A.K.,
            Plugatar,Y.V. and Oberemok,V.
  TITLE     Mixed insect pest populations of Diaspididae species under control
            of oligonucleotide insecticides: 3'-end nucleotide matters
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 108)
  AUTHORS   Gal'chinsky,N.V. and Oberemok,V.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (23-NOV-2023) Department of Molecular Genetics and
            Biotechnologies, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, 4
            Vernadskogo Avenue, Simferopol, Crimea 295007, Russia
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
   source             1..108
                     /organism="Aonidia lauri"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /specimen_voucher="NBG:03"
                     /db_xref="taxon:2038800"
                     /geo_loc_name="Russia"
                     /collection_date="25-Dec-2020"
   rRNA               <1..>108
                     /product="large subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
  1 atggggaaga tgggtgtccg agtacacgtt ccgcatcgtg tggcatcgcg gccggacacc
  61 cgcattcccg gggcgtctca acggcccgtc gcggatgcgg acggtcgt
//

```

Рисунок 1. Последовательность из 108 нуклеотидов загружена в систему GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) под номером OR852409.1

Приложение 3. Результаты секвенирования фрагмента гена 28S рРНК британской щитовки *Dynaspidiotus britannicus* Newstead (обнаруженной в ФГБУН «НБС-НИЦ»).

Dynaspidiotus britannicus voucher NBG:05 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OR897816.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

```

LOCUS       OR897816                108 bp    DNA     linear   INV 19-JAN-2024
DEFINITION  Dynaspidiotus britannicus voucher NBG:05 large subunit ribosomal
             RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   OR897816
VERSION     OR897816.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Dynaspidiotus britannicus
  ORGANISM  Dynaspidiotus britannicus
             Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;
             Pterygota; Neoptera; Paraneoptera; Hemiptera; Sternorrhyncha;
             Coccoidea; Diaspididae; Dynaspidiotus.
REFERENCE   1 (bases 1 to 108)
  AUTHORS   Gal'chinsky,N.V., Yatskova,E.V., Novikov,I.A., Sharmagiy,A.K.,
             Plugatar,Y.V. and Oberemok,V.
  TITLE     Mixed insect pest populations of Diaspididae species under control
             of oligonucleotide insecticides: 3'-end nucleotide matters
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 108)
  AUTHORS   Gal'chinsky,N.V. and Oberemok,V.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (03-DEC-2023) Department of Molecular Genetics and
             Biotechnologies, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, 4
             Vernadskogo Avenue, Simferopol, Crimea 295007, Russia
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
             Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
             ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source             1..108
                       /organism="Dynaspidiotus britannicus"
                       /mol_type="genomic DNA"
                       /specimen_voucher="NBG:05"
                       /db_xref="taxon:2038838"
                       /geo_loc_name="Russia"
                       /collection_date="25-Dec-2020"
     rRNA             <1..>108
                       /product="large subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
  1 atggggaaga tgggtgccg agtacacgtt ccgcatcgt cggtatcgcg gccgggacc
  61 cgcatcccg gggcgtctca acggcccgtc gctgatcgg acagtcgt
//

```

Рисунок 1. Последовательность из 108 нуклеотидов загружена в систему GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) под номером OR897816.1