

На правах рукописи

РОЦКАЯ

Ульяна Николаевна

**АНТИГРИБНОЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ
КОЛОРАДСКОГО ЖУКА *Leptinotarsa decemlineata* (Say):
РОЛЬ РИЦИН-ПОДОБНЫХ β -ЛЕКТИНОВ**

1.5.14 – Энтомология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в лаборатории патологии насекомых Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института систематики и экологии животных СО РАН

Научный руководитель:

Крюков Вадим Юрьевич

доктор биологических наук, заведующий лабораторией экологической паразитологии ИСиЭЖ СО РАН

Официальные оппоненты:

Яковлев Андрей Юрьевич

кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», кафедра энтомологии, научный сотрудник лаборатории биофармакологии и иммунологии насекомых

Пахарукова Мария Юрьевна

доктор биологических наук, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов

Ведущая организация: Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, г. Москва

Защита состоится «__» _____ 2026 г. в ____ на заседании диссертационного совета 24.1.1119.01 на базе Института систематики и экологии животных СО РАН по адресу: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, д. 11

Тел./факс: +7 (383)217-09-73, e-mail: dis@eco.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН ИСиЭЖ СО РАН и на сайте <http://www.eco.nsc.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Петрожицкая

Людмила Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Насекомые занимают лидирующую позицию в «эволюционном марафоне» с девонского периода благодаря их способности выживать в самых разнообразных средах обитания. В ходе освоения этих сред насекомые на протяжении миллионов лет сталкивались с разнообразными инфекциями, вызванными бактериями, вирусами, грибами, а также паразитарными инвазиями. Тот факт, что на разных стадиях жизненного цикла насекомые могут жить в различных средах обитания (Holometabola), обуславливает их взаимодействие с ещё более широким спектром патогенов. Продолжительная коэволюция системы патоген-насекомое привела к формированию эффективной системы врожденного иммунитета (Kojour et al., 2022).

Колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata* (Say)) является экономически значимым вредителем, способным наносить катастрофический урон агрокультурам семейства паслёновые, особенно картофелю (*Solanum tuberosum*). За полтора века колорадский жук смог выработать устойчивость к более чем 50 инсектицидам из разных классов (Chen et al., 2023). В базе данных Комитета по борьбе с устойчивостью к инсектицидам, которая регистрирует все официальные случаи устойчивости к инсектицидам, колорадский жук входит в число видов, наиболее быстро развивающих устойчивость к новым инсектицидам (Chen et al., 2023). Поэтому необходим поиск альтернативных методов регуляции численности этого вида.

Энтомопатогенные аскомицеты родов *Metarhizium*, *Beauveria* и *Cordyceps* (ранее рода *Isaria*, *Paecilomyces*) – одни из основных естественных регуляторов численности колорадского жука. Кроме того, различные виды этих грибов используются для разработки биоинсектицидных препаратов (Islam et al., 2021). Проникновение грибных пропагул через кутикулу и последующее развитие в гемоцеле насекомых вызывает сложный иммунный ответ, развивающийся в тканях интегументов, жировом теле, гемоцитах и других тканях (Cao et al., 2015; 2023; Khan et al., 2023). Для отряда жесткокрылых (Coleoptera) функционирование иммуносигнальных путей довольно детально изучено для модельных видов *Tribolium castaneum* (Herbst) и *Tenebrio molitor* L. (Tenebrionidae), но не для колорадского жука (Takov et al., 2022).

В ходе геномных и транскриптомных исследований видов Coleoptera (*T. molitor*, *T. castaneum*, *Asbolus verrucosus* LeConte, *Zophobas morio* Fabricius) были обнаружены последовательности, охарактеризованные как лектины R-типа или рибцин-подобные β-лектины. На данный момент Р-лектины найдены только у двух отрядов насекомых: жесткокрылых (Coleoptera) и тараканов (Blattoidea). Семейство лектинов этого типа получило такое название ввиду наличия специфического углевод-распознающего домена (анг. CRD – carbohydrate recognition domain) - QxW,

первоначально обнаруженного в полипротеине рицина – токсина растения *Ricinus communis*. Работ по свойствам рицин-подобных β -лектинов насекомых и их участию в иммунном ответе пока нет (Kim et al., 2013), но для R-лектинов других видов беспозвоночных, например, для лектина CEL-III морского коралла *Ctenactis echinata*, показана гемагглютинирующая активность (Uchida et al., 2004; Hatakeyama et al., 1996). Также показана способность R-лектина из *R. communis* связываться с клеточной стенкой грибов *Beauveria bassiana* (Wanchoo et al., 2009).

Изучение экспрессии генов – потенциальных эффекторов иммунного ответа колорадского жука и, в частности, рицин-подобных β -лектинов, анализ механизмов их регуляции, антигрибных свойств кодируемых ими белков, имеет потенциал для развития новейших стратегий биологического контроля, основанных на специфическом ингибировании иммуносигнальных путей конкретных видов насекомых. Перспективой нашей работы может быть разработка биопрепаратов на основе комбинаций патогенных микроорганизмов и ингибиторов критических узлов иммунного ответа колорадского жука.

Степень разработанности темы исследования. Существует большое количество исследований по грибным патогенам колорадского жука и разработке методов биологического контроля на их основе, но молекулярные механизмы в системе хозяин-микопатоген практически не изучались. До наших исследований устойчивость жука к грибным патогенам изучалась в контексте конститутивной защиты, биохимического ответа (активности фенолоксидаз, антиоксидантных и детоксицирующих ферментов) и изменений параметров клеточного иммунитета (обзор: Takov et al., 2022). При этом ответ со стороны генов иммунной системы и, в частности, рицин-подобных β -лектинов на грибные инфекции у колорадского жука оставался неисследованным. Что касается молекулярно-генетических исследований, то по состоянию на 2025 год в базах NCBI представлены пять аннотированных геномов и транскриптомов колорадского жука. Референсным транскриптомом является Genome assembly Ldec_3_MD GCF_025532065.1. По генам колорадского жука составлен генетический атлас, в котором аннотированы основные гены, связанные с иммунитетом (Wilhelm et al., 2025). Имеется ряд исследований транскриптомного ответа на стрессирующие воздействия и инсектицидные препараты (Schoville et al., 2018; Péliissié et al., 2022).

Цель работы: установить роль рицин-подобных β -лектинов в системе антигрибной защиты колорадского жука и их связь с иммуносигнальными путями насекомого.

Задачи исследования:

1. Оценить изменения в экспрессии генов рицин-подобных β -лектинов и других генов иммунитета у личинок колорадского жука в ответ на грибные

инфекции *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii* и *Cordyceps fumosorosea* на разных этапах патогенеза в тканях кутикулы, жирового тела и гемоцитах;

2. Сопоставить изменение экспрессии гена рицин-подобного β -лектина в ответ на различные виды стресса и грибную инфекцию у личинок колорадского жука;

3. Провести биоинформатический анализ структуры и свойств рицин-подобных лектинов колорадского жука;

4. Изучить фунгицидные свойства β -лектина токсина рицина и рекомбинантного рицин-подобного β -лектина колорадского жука по отношению к энтомопатогенным грибам в тестах *in vitro*;

5. Оценить влияние нокдауна гена рицин-подобного β -лектина, а также транскрипционных факторов сигнальных путей Toll и JAK/STAT на выживаемость личинок при грибной инфекции и экспрессию других генов, связанных с иммунным ответом.

Научная новизна. Впервые получены данные об экспрессии генов рицин-подобных β -лектинов (*RBL*) и ряда других генов иммунитета в тканях личинок колорадского жука на разных этапах патогенеза, вызванного энтомопатогенными грибами. Впервые показано значительное усиление экспрессии генов *RBL* в тканях кутикулы, жирового тела и гемоцитов насекомых в ответ на заражение разными видами грибов. Выявлено, что экспрессия гена *LdRBLk* возрастает не только в ответ на грибные инфекции, но и в ответ на разные виды стресса вместе с другими эффекторами иммунного ответа. Теоретически обоснована способность белка *LdRBLk* взаимодействовать с клеточной стенкой энтомопатогенных грибов и экспериментально установлено, что это приводит к её разрушению. Показано, что нокдаун экспрессии гена *LdRBLk* не влияет на выживаемость личинок колорадского жука после заражения грибом, однако подавление экспрессии генов транскрипционных факторов иммуносигнального пути Toll (*DorsalDif*) ведёт к снижению экспрессии не менее чем двух паралогов гена (*LdRBLk* и *RBLn*), что сопряжено со снижением выживаемости личинок колорадского жука при грибной инфекции.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты работы позволяют рассматривать рицин-подобные β -лектины как полноценные эффекторы, участвующие в антигрибном ответе у колорадского жука и регуляторно связанные с путем Toll. Полученные данные позволяют обосновать выбор тканей и стадий патогенеза для анализа экспрессии генов иммунного ответа колорадского жука. Проведенный анализ предлагает целевые гены для нокдауна и, соответственно, повышения восприимчивости личинок жука к грибным инфекциям, что перспективно для разработки новых биоинсектицидов на основе энтомопатогенных грибов и интерферирующих РНК. Новые антигрибные лектины могут иметь потенциал применения в защите растений от фитопатогенов, а также в ветеринарии и медицине.

Положения, выносимые на защиту:

1. Усиление экспрессии генов рицин-подобных β -лектинов колорадского жука в ответ на грибные инфекции происходит в кутикуле, жировом теле и гемоцитах и наиболее выражено на этапе инкапсуляции патогенов.

2. Свойства рицин-подобных β -лектинов колорадского жука позволяют им связываться с клеточной стенкой грибов по механизму «ковёр», ингибировать рост энтомопатогенных грибов вплоть до остановки развития и разрушения спор и гиф.

3. Регуляция экспрессии генов рицин-подобных β -лектинов связана с иммуносигнальным путем Toll; нокдаун факторов транскрипции этого пути приводит к снижению экспрессии генов указанных лектинов и к повышению восприимчивости к энтомопатогенным грибам.

Степень достоверности результатов и апробации результатов.

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием стандартизированных протоколов, позволяющих достичь воспроизводимости экспериментов, современных реактивов, генотипированных линий микроорганизмов, достаточным количеством биологических (не менее пяти) и аналитических (не менее трех) повторностей в экспериментах, независимым повторением экспериментов в течение ряда лет, использованием соответствующей статистической обработки данных в программах STATISTICA 8.0, SigmaStat 3.1, PAST 3, а также публикацией результатов в журналах первого и второго квартилей (Scopus).

Основные результаты работы представлены очно на всероссийских конференциях с международным участием: “Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования” (Пермь, 2021), XVI съезд Русского энтомологического общества (Москва, 2022), VII Съезд Паразитологического общества: итоги и актуальные задачи (Петрозаводск, 2023), IV Всероссийской конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, 2025).

Публикации. По теме публикации были опубликованы 5 научных статей, индексируемых базами Web of Science и Scopus и входящих в перечень ВАК.

Личный вклад автора. Основная часть работы была выполнена автором лично. Постановка и проведение экспериментов, препарирование тканей колорадского жука, выделение суммарной РНК и ДНК, получение кДНК, проведение количественной ПЦР и обработка данных, подбор и отработка праймеров на целевые гены, наработка дцРНК, работа с онлайн программами и базами данных, статистическая обработка данных выполнены лично автором. Работы по фунгицидной активности рицин-подобного β -лектина проведены совместно с к.б.н. М.В. Тюриным (ИСиЭЖ СО РАН, Новосибирск); атомно-силовая микроскопия – совместно с к.б.н.

А.С. Васильченко и к.т.н. А.Н. Бобылевым (ТюмГУ, Тюмень). Подготовка срезов и проведение электронной микроскопии проведены А.А. Миллером (ИФПМ СО РАН, г. Томск). Работы по тестированию дцРНК проведены совместно с к.б.н. О.Н. Ярославцевой (ИСиЭЖ СО РАН).

Объём и структура диссертации. Работа состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Список использованных источников насчитывает 287 наименований, из них 287 – на английском языке. Текст диссертации изложен на 170 страницах и содержит 40 рисунков и 7 таблиц.

Благодарности. Автор выражает благодарность заведующему Карасукским биологическим стационаром ИСиЭЖ СО РАН – к.б.н. В.А. Шило, всему коллективу лабораторий патологии насекомых и экологической паразитологии ИСиЭЖ СО РАН, в особенности к.б.н. М.В. Тюрину, к.б.н. Ю.А. Носкову, к.с.-х.н. О.Г. Томиловой, к.б.н. О.В. Поленоговой, Д.А. Сидоренко, Е.С. Косман, Е.Э. Мазиной, Е.А. Дайтхе и к.б.н. О.Н. Ярославцевой за помощь с биотестированиями и отбором биоматериалов. За помощь в проведении атомно-силовой микроскопии к.б.н. А.С. Васильченко и к.т.н. А.Н. Бобылеву. За предоставление плазмиды с последовательностью зелёного флуоресцентного белка С.А. Тимофеева и д.б.н. В.В. Долгих. За помощь на различных этапах работы и ценные рекомендации при подготовке рукописи я искренне признательна к.б.н. Ю.Ю. Илинскому, д.б.н. А.Г. Бугрову, д.б.н., чл.-корр. РАН В.В. Глупову и к.б.н. Н.А. Крюковой.

Работа поддержана грантами Российского научного фонда № 22-14-00309 и 19-14-00138, а также проектом Госзадания № FWGS-2021-0001.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Представлена современная информация об иммуносигнальных каскадах насекомых, эффекторах иммунного ответа и возможной роли лектинов R-типа в иммунитете. Рассмотрены механизмы РНК-интерференции у представителей отряда жесткокрылых (Coleoptera).

Глава 2. Материалы и методы

В работе использованы насекомые из природных популяций колорадского жука (далее КЖ), собранные в Новосибирской области, и культуры энтомопатогенных грибов *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii* и *Cordyceps fumosorosea* из коллекции ИСиЭЖ СО РАН. Во всех экспериментах для заражения использованы личинки IV возраста (2-4 ч после линьки). Получение спор грибов, заражение насекомых и учёт выживаемости проводили согласно Крюков и др. (2011) и Rotskaya et al. (2021).

Для анализа экспрессии генов пробоподготовку тканей, выделение РНК, получение кДНК и кПЦР проводили по опубликованным методикам (Rotskaya et al., 2021; Kryukov et al., 2021, 2022, 2026). В качестве

референсных генов использовали гены рибосомальных белков 4 и 18 (*RpL4* и *RpL18*) и фактор рибозилирования белков (*Arl19*) (Shi et al., 2013; Rotskaya et al., 2021). Целевые гены указаны ниже. Подбор генов интереса и дизайн праймеров осуществлен в программах NCBI Primer-BLAST и IDT OligoAnalyzer Tool.

В рамках задачи 1 анализировали эффекты инфекций, вызываемых разными видами грибов, на экспрессию генов R-лектинов и ряда других генов иммунного ответа. Для заражения использованы штаммы *B. bassiana* (Sar-31), *M. robertsii* (MB-1) и *C. fumosorosea* (Pad-2). Через 24 ч после перкутанного заражения конидиями (этап проникновения через кутикулу), а также через 72 ч (этап инкапсуляции патогенов) были взяты ткани кутикулы, жирового тела и гемоцитов. Методом кПЦП исследовано изменение экспрессии генов рецепторов иммуносигнальных путей (*PGRP-LF*, *PGRP-SC*, *Toll1_rec*), генов, регулирующих транскрипцию АМП (*cactus-like*, *DorsalDif1*), рицин-подобных β -лектинов (далее R-лектины) (*LdRBLk*, *RBLn*), С-лектина (*perlucin*) и генов АМП (*attacin-34*, *tenecin-3*, *holotricin-3*).

В рамках задачи 2 были проанализированы изменения экспрессии генов R-лектинов в ответ на различные стрессы. В качестве стресс-факторов использовали термический ожог (прикосновение к кутикуле разогретой иглой); химический ожог (нанесение на кутикулу 5 мкл 15% соляной кислоты); ампутацию диститарсуса передней лапки; топикальное инфицирование *M. robertsii* (5 мкл суспензии с титром $2 \cdot 10^8$ конидий/мл). Через 24 ч были взяты ткани жирового тела и кутикулы. Исследовали изменение экспрессии генов R-лектина (*LdRBLk*), транскрипционных факторов (*NFkB*, *DorsalDif1*, *Stat*), одорант-связывающего белка (*obp*), АМП (*attacin-34*, *aca-17*) и белков теплового шока (*hsp70* и *hsp90*).

В рамках задачи 3 для биоинформатического исследования *LdRBLk* проводили анализ его нуклеотидной и аминокислотной последовательности в программах NCBI BLAST, NCBI ORFfinder, ExPASy, SOPMA, SWISS-MODEL, SignalP-5.0 server, TMpred, I-TASSER и ProtScale. Скорость накопления мутаций рассчитывали по Nachman and Crowell (2005). Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей R-лектинов КЖ и других организмов проведен с помощью метода максимального правдоподобия в программе MEGA X по модели Уилана и Голдмана +F (Whelan and Goldman, 2001).

В рамках задачи 4 оценено влияние R-лектинов на грибы *M. robertsii* и *B. bassiana* в тестах *in vitro*. В экспериментах использована β -субъединица токсина рицин (*RBL*) (Sigma-Aldrich) и рекомбинантный R-лектин КЖ *LdRBLk*, синтезированный в культуре клеток насекомых в ООО «Белки-Антитела». Для оценки влияния *RBL* на прорастание конидий *B. bassiana* (Sar-31) и *M. robertsii* (P-72) в бульон Сабуро добавляли *RBL* для достижения конечных концентраций 100, 50, 25 и 12,5 мкг/мл и инокулировали конидиями грибов. После 36 ч инкубации в шейкере проводили подсчёт

проросших и непроросших конидий под световым микроскопом. Электронная трансмиссионная микроскопия конидий проведена ИФПМ СО РАН (г. Томск). Оценка влияния рекомбинантного лектина *LdRBLk* на прорастание конидий *M. robertsii* проводилась в указанной выше среде с концентрациями лектина 20, 10, 5, 1, 0,5 и 0,1 мкг/мл с помощью световой микроскопии. Оценка структурных изменений клеточной стенки гриба *M. robertsii* проведена методом атомно-силовой микроскопии на приборе NT-MDT Ntegra Aura.

В рамках задачи 5 для исследования влияния нокдауна *LdRBLk* и факторов транскрипции *Stat* и *Dorsal* на восприимчивость жука к грибной инфекции личинкам инъецировали 4 мкл раствора дцРНК (800 нг/личинку). Использовали дцРНК *dsLdRBLk* непосредственно для нокдауна исследуемого лектина, *dsStat* для нокдауна фактора транскрипции пути JAK/STAT, смесь *dsDorsalDif1+dsDorsalDif2* для нокдауна факторов транскрипции пути Toll. В качестве контроля проводили инъекцию дцРНК зелёного флуоресцентного белка - *dsGFP*. дцРНК была получена с помощью набора для проведения T7-транскрипции *in vitro* (Биолабмикс, Россия) согласно протоколам производителя. Через 3 часа после инъекций личинок перкутанно заражали суспензией *B. bassiana*, либо обрабатывали водой (контроль). Через 72 ч проводили отбор тканей жирового тела. Была проанализирована экспрессия генов транскрипционных факторов (*NFkB*, *DorsalDif1*, *DorsalDif2*, *Stat*) и R-лектинов (*LdRBLk*, *RBLn*).

Статистика

Различия в динамике смертности насекомых оценивали с помощью лог-ранк теста. Данные по экспрессии генов анализировали с помощью теста Данна (Dunn's test). Различия в скорости прорастания конидий анализировали с помощью t-теста либо дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки. Для анализа и визуализации данных использованы программы PAST 3, SigmaStat 3.5, Statistica 8. Данные по экспрессии генов представлены на графиках в виде средних арифметических значений и стандартных ошибок (SE).

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Экспрессия генов иммунного ответа в тканях кутикулы, жирового тела и гемоцитах на разных этапах развития грибных инфекций.

Смертность личинок после инфицирования *B. bassiana*, *M. robertsii* и *C. fumosorosea* достигала 95 – 100% на 12 сутки, тогда как в контроле гибель не превышала 3%. Симптомы инкапсуляции патогенов (меланистические пятна под кутикулой) появлялись у насекомых на 3 сутки после инфицирования.

Показано, что индукция генов, кодирующих R-лектины *LdRBLk* и *RBLn*, наблюдается во всех исследуемых тканях (кутикуле, жировом теле и

гемоцитах) КЖ в ответ на заражение всеми изучаемыми грибами (Рис. 1), что свидетельствует в пользу участия R-лектинов в антигрибном иммунном ответе. Резкое повышение экспрессии генов R-лектинов наблюдалось на этапе инкапсуляции патогенов (72 часа после инфицирования), как и для большинства других исследуемых генов иммунного ответа. Следует отметить, что подъём экспрессии генов *LdRBLk* и *RBLn* сопровождался подъёмом экспрессии гена фактора транскрипции пути Toll *DorsalDif1*, его регулятора *cactus*, а также генов эффекторов иммунного ответа *attacin-34*, *holotricin-3*, *tenecin-3* и *perlucin*. При этом экспрессия R-лектинов изменялась противоположно экспрессии *catalase-56*.

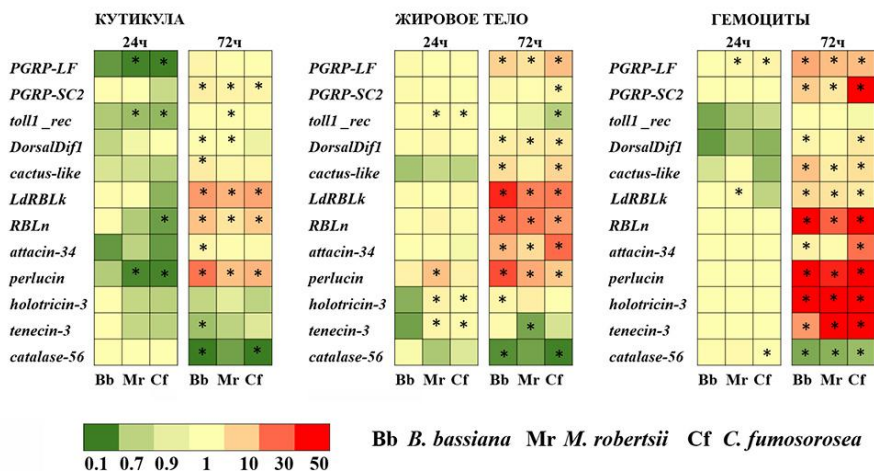


Рис. 1. Изменения экспрессии генов иммунного ответа у личинок КЖ в тканях кутикулы, жирового тела и в гемоцитах через 24 ч и 72 ч после заражения грибами *B. bassiana*, *M. robertsii* и *C. fumosorosea* (2×10^6 конидий/мл). Экспрессия генов показана относительно контрольного варианта. * - достоверные отличия от контрольного варианта (тест Данна, $p < 0,05$).

3.2. Экспрессия гена *LdRBLk* в системе иммунного ответа после стрессовых воздействий и топикального заражения грибом

Чтобы определить, является ли повышение экспрессии гена R-лектина *LdRBLk* специфической реакцией на грибные инфекции, мы провели эксперименты по изучению его экспрессии после топикального инфицирования *M. robertsii* и различных повреждений кутикулы, таких как термический и химический ожоги, а также ампутация диститарсуса передней лапки.

После ампутации диститарсуса все личинки выживали в течение 8 суток, как и в контрольном варианте. После химического и термического ожогов низкая смертность (13–17%) наблюдалась только на первые и вторые сутки. Топикальное заражение *M. robertsii* (2×10^6 конидий на личинку) привело к 60% смертности на 8-е сутки.

В ткани кутикулы через 24 часа зарегистрировано существенное 5-10-кратное усиление экспрессии *LdRBLk* в ответ на термический ожог и грибную инфекцию (Рис. 2). Несущественное увеличение экспрессии *LdRBLk* в этой ткани наблюдалось после химического ожога и ампутации диститарсуса. В жировом теле также было зарегистрировано значительное увеличение экспрессии гена *LdRBLk* после термического ожога и ампутации.

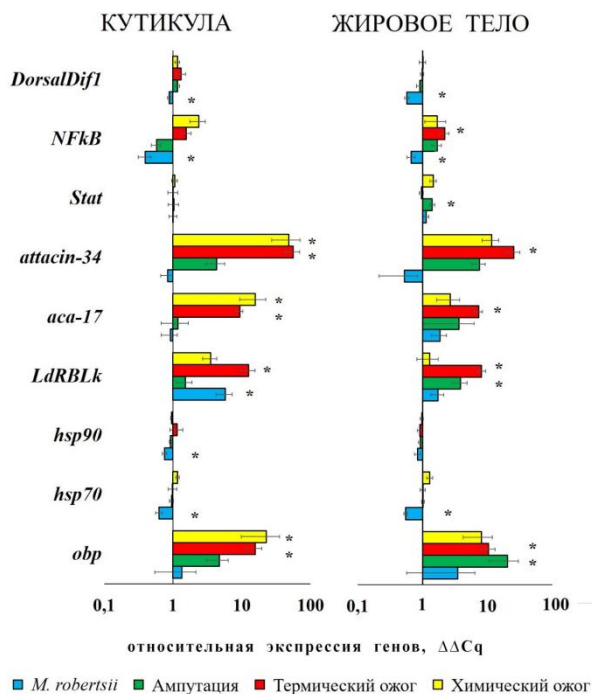


Рис. 2. Изменение экспрессии генов в тканях кутикулы и жирового тела КЖ через 24 ч после химического и термического ожогов, ампутации диститарсуса передней лапки и топикального заражения *M. robertsii* (2×10^6 конидий на личинку). Экспрессия генов показана относительно контрольного варианта (нанесение 5 мкл воды). * - достоверные отличия от контрольного варианта (тест Данна, $p < 0,05$).

Другие виды обработки (химический ожог и грибная инфекция) не привели к изменению экспрессии гена *LdRBLk* в жировом теле.

Гены транскрипционных факторов путей Toll, IMD и JAK/STAT (*DorsalDif1*, *NFkB* и *Stat*) показали слабые изменения экспрессии после исследуемых воздействий, хотя для *NFkB* регистрировалось существенное усиление экспрессии в ответ на термический ожог в жировом теле и снижение экспрессии в ответ на грибную инфекцию в обеих тканях. Для *Stat* регистрировалось существенное усиление экспрессии только в ответ на ампутацию.

Экспрессия генов АМП *attacin-34* и *aca-17* существенно усиливалась в кутикуле и/или жировом теле только после химического и термического ожогов. Важно отметить, что обнаружена тесная корреляция между экспрессией *attacin-34*, *aca-17* и *LdRBLk* в жировом теле ($r > 0,91$, $p < 0,03$), хотя значимой корреляции в кутикуле не наблюдалось ($r < 0,67$, $p > 0,22$).

Нами не зарегистрировано усиления экспрессии генов белков теплового шока (*hsp70*, *hsp90*) в ответ на указанные стресс-воздействия. В ответ на грибную инфекцию отмечалась даунрегуляция этих генов в обеих тканях (Рис. 2).

Таким образом, экспрессия гена *LdRBLk* усиливается в ответ на различные виды стресса. При этом паттерн его экспрессии сходен с паттерном других эффекторов иммунного ответа – аттацина и акалолептина, но не с паттерном маркеров стресса – белков теплового шока. Усиление экспрессии эффекторных генов иммунитета не только в ответ на инфекции, но и в ответ на различные типы стресса соотносится с данными других авторов (Mowlds and Kavanagh, 2008; Liu et al., 2026).

3.3. Анализ структуры *LdRBLk*

3.3.1. Анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей

Биоинформатический анализ структуры *LdRBLk* в программах NCBI ORFfinder, ExPASy, SOPMA, SWISS-MODEL, SignalP-5.0 server, TMpred, I-TASSER и ProtScale показал следующее: 1) лектин содержит β -трилистниковый домен (Рис. 3А); 2) лектин является амфифильным белком, т. е. у него есть гидрофильный центр и гидрофобные концы; 3) лектин не является сигнальным или трансмембранным белком; содержит высоко консервативный QxW-домен, связывающий углеводные лиганды, при этом наиболее вероятными лигандами являются галактоза и N-ацетил-D-галактозамин (Рис. 3Б). В главе делается заключение, что *LdRBLk* теоретически может связываться с клеточной стенкой грибов по механизму «ковёр» и приводить к разрушению грибных пропагул. Механизм ковра реализуется на основе того, что молекулы белка выстилают поверхность мембраны патогена, приводя к изменению её конформации и последующему разрушению клетки (Zhang et al., 2020).

3.3.2. Филогенетический анализ LdRBLk

Установление филогенетических связей между всеми R-лектинами КЖ, а также R-лектинами других организмов показало, что все четыре R-лектина КЖ являются паралогами, то есть образовались в результате дупликации одного гена. При этом по отношению к R-лектинам бактерий, грибов, растений и жесткокрылых насекомых они являются ортологами, то есть имеют общее происхождение.

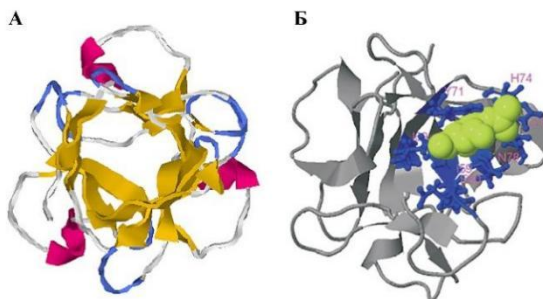


Рис. 3. А - Третичная структура белка LdRBLk, программа I-TASSER. Б - Сайт связывания лиганда (N-ацетил-D-галактозамин) для белка LdRBLk, программа I-TASSER.

3.4 Влияние гомолога β -лектина рицина (RBL) и рекомбинантного LdRBLk на энтомопатогенные грибы *in vitro*

Культивирование грибов *M. robertsii* и *B. bassiana* в бульоне Сабуро с добавлением RBL *R. communis* показало дозозависимое снижение прорастания конидий. Ингибирование прорастания *B. bassiana* более чем на 90% наблюдалось при концентрации 50 мкг/мл, а *M. robertsii* – при концентрации 100 мкг/мл. Световая микроскопия показала, что в образцах, содержащих RBL, присутствовала мелкодисперсная взвесь, фрагменты разрушенного мицелия и наблюдалась агглютинация грибных пропагул.

При культивировании бластоспор гриба *M. robertsii* в вышеуказанной среде с рекомбинантным лектином LdRBLk (1 мкг/мл) наблюдалось замедление роста ростовых трубок (Рис. 4А), разрушение клеточной стенки гриба с вытеканием клеточного содержимого, «лопнувшие» бластоспоры и ростовые трубки (Рис. 4 Б, В), а также частицы клеточного дебриса. При этом в клеточной стенке бластоспор не выявлено изменений, соответствующих повреждениям порового типа. Полученные данные подтверждают теоретически предсказанную способность R-лектина LdRBLk взаимодействовать с клеточной стенкой грибов по механизму «ковёр» (Zhang et al., 2020).

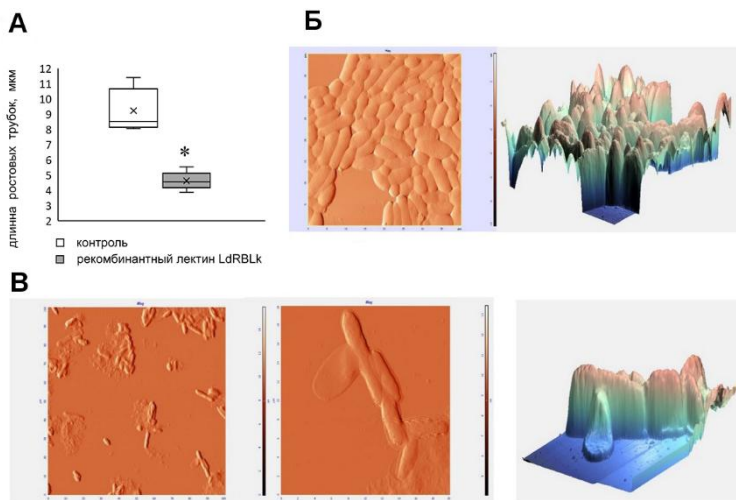


Рис. 4. Влияние рекомбинантного R-лектина КЖ LdRBLk на гриб *M. robertsii*. **А** – Длина ростовых трубок через 24 часа в контрольной среде Сабуро и в той же среде с добавлением LdRBLk в концентрации 1 мкг/мл (* - $t = 6,6$; $p = 0,0002$). **Б** – атомно силовая микроскопия бластоспор, инкубированных в контрольной среде в течение 12 часов. **В** – атомно силовая микроскопия бластоспор, инкубированных в той же среде с добавлением LdRBLk (8,3 мкг/мл).

3.5. Оценка влияния нокдауна генов *LdRBLk*, *Stat* и *DorsalDif* на восприимчивость личинок к грибной инфекции и регуляцию генов иммунного ответа

Нокдаун *LdRBLk* не оказывал достоверного воздействия на смертность личинок КЖ, как в вариантах с инфицированием *B. bassiana*, так и без инфекции (Рис. 5). Это может объясняться наличием у КЖ четырёх паралогов исследуемого R-лектина. С другой стороны, нокдаун генов *DorsalDif* – факторов транскрипции главного антигрибного пути Toll – снижал уровень экспрессии не менее чем двух паралогов исследуемых лектинов (*LdRBLk* и *RBLn*), что сопровождалось резким повышением восприимчивости личинок к грибу *B. bassiana* (Рис. 5). В частности, инъекции *dsDorsalDif*×2 приводили к существенно более ранней и высокой

смертности. Медианное летальное время (LT_{50}) после обработки *dsGFP+B. bassiana* составило $8 \pm 0,6$ суток, а после обработки *dsDorsalDif×2+B. bassiana* – $5,5 \pm 0,2$ суток ($p < 0,0001$). Общая смертность за 10 суток составила 70% и 100% для *dsGFP+B. bassiana* и *dsDorsalDif×2+B. bassiana* соответственно. Следует отметить, что в варианте *dsDorsalDif×2+B. bassiana* личинки имели другие симптомы микоза, по сравнению с вариантом *dsGFP+B. bassiana*: первые характеризовались менее выраженными симптомами инкапсуляции и меланизации.

Инъекция *dsDorsalDif×2* без грибной инфекции приводила к достоверному снижению экспрессии генов *DorsalDif1*, *LdRBLk* и *RBLn* в 2-3 раза (Рис. 5). Экспрессия гена *DorsalDif2* снижалась в 1,6 раза, но не существенно. В варианте с грибной инфекцией у всех анализируемых генов экспрессия была существенно ниже (в 5,4 – 10,2 раза) в варианте *dsDorsalDif×2+B. bassiana*, по сравнению с *dsGFP+B. bassiana*.

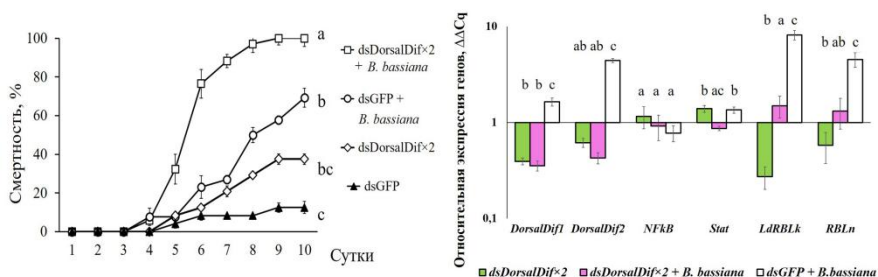


Рис. 5. Смертность в течение 10 суток и экспрессия генов иммунного ответа в жировом теле личинок КЖ через 72 часа после инъекций *dsDorsalDif1/DorsalDif2* и перкутанного заражения *B. bassiana* (2×10^6 конидий/мл). На графике с динамикой смертности разные буквы указывают на существенные различия (лог-ранк тест, $P < 0.01$). На графике с экспрессией генов показаны отличия от контроля (*dsGFP*), при этом, а – отсутствие существенных различий от указанного контроля; разные буквы показывают достоверные различия между вариантами (тест Данна, $p < 0,05$).

Также установлено, что нокдаун *DorsalDif×2* не оказывал существенного воздействия на экспрессию транскрипционного фактора IMD-пути (*NFκB*), как в случае с грибной инфекцией, так и без неё. Следует также отметить, что нокдаун *DorsalDif×2* приводил к усилению экспрессии фактора транскрипции пути JAK/STAT (*Stat*) в отсутствие инфекции *B. bassiana*. Однако при грибной инфекции нокдаун *DorsalDif×2* приводил к блокированию подъёма экспрессии *Stat* (Рис. 5). Последнее может свидетельствовать о наличии кросс-регулирующих путей Toll и Jak/Stat у КЖ.

Нокдаун гена фактора транскрипции *Stat* также приводил к повышению восприимчивости личинок к *B. bassiana* (Рис. 6). Так, LT_{50} после обработки *dsGFP+B. bassiana* составило $9 \pm 0,5$ суток, а после обработки *dsStat+B. bassiana* – $8 \pm 0,5$ суток ($p = 0,009$). Общая смертность на 10 сутки составила 66% для *dsGFP+B. bassiana* и 90% для *dsStat+B. bassiana*.

Экспрессия гена транскрипционного фактора *STAT* в результате целевого нокдауна снижалась в 7 раз у личинок без грибной инфекции и в 11 раз в варианте с грибной инфекцией ($p < 0,0008$). Инъекции *dsStat* приводили к росту экспрессии гена *LdRBLk* в 2,6 раза в варианте без инфекции *B. bassiana*. При грибной инфекции нокдаун *Stat* не оказал никакого влияния на экспрессию *LdRBLk* и *RBLn*.

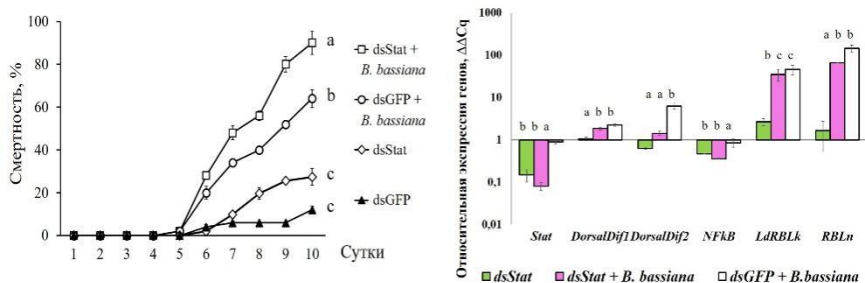


Рис. 6. Смертность в течение 10 суток и экспрессия генов иммунного ответа в жировом теле личинок КЖ через 72 часа после инъекций *dsStat* и перкутанного заражения *B. bassiana* (2×10^6 конидий/мл). На графике с динамикой смертности разные буквы указывают на существенные различия (лог-ранк тест, $P < 0.01$). На графике с экспрессией генов показаны отличия от контроля (*dsGFP*), при этом, а - отсутствие существенных различий от контроля (*dsGFP*); разные буквы показывают достоверные различия между вариантами (тест Данна, $p < 0,05$).

Таким образом, нокдаун гена *LdRBLk* не приводит к изменению восприимчивости КЖ к грибной инфекции. Однако нокдаун генов транскрипционных факторов *DorsalDif* приводит к ингибированию не менее чем двух паралогов R-лектинов (*LdRBLk* и *RBLn*) и более быстрой и высокой гибели личинок после заражения грибом. Кроме того, нокдаун генов *DorsalDif*, по всей видимости, меняет ответ со стороны пути JAK/STAT, а также клеточного иммунитета и фенолоксидазной системы КЖ. Последнее позволяет предположить, что транскрипционный фактор *DorsalDif* у КЖ участвует не только в экспрессии АМП, но и в формировании клеточно-меланизационных очагов при грибной инфекции. Toll-активация и ФО-каскад включаются через общие механизмы, связанные с активацией

сериновых протеаз (Zdybicka-Barabas et al., 2025). При нокдауне генов транскрипционного фактора *DorsalDif* может происходить потеря обратной связи с экспрессией генов начального этапа каскада передачи сигнала по Toll-пути (Toll-рецепторов и сериновых протеаз), и тогда профенолоксидазы не будут активироваться на гифальных телах гриба. С другой стороны, при блокировании Toll пути более низкая продукция эффекторов иммунного ответа (АМП, R-лектины) может приводить к более низкому уровню деформаций/разрушений грибных пропагул и, соответственно, к меньшему высвобождению в гемолимфу молекулярных фрагментов, ассоциированных с патогенами и повреждениями, что и приводит к более низкому уровню меланизации и инкапсуляции. Последующие исследования могут быть сфокусированы на понимании влияния поздних (нижележащих) компонентов каскада Toll-пути на механизмы регуляции фенолоксидазного каскада и экспрессии генов R-лектинов, а также на их влияния на процессы инкапсуляции у КЖ.

С прикладной точки зрения, результаты по нокдауну генов *DorsalDif* могут быть перспективными для разработки комбинированных препаратов, сочетающих конидии энтомопатогенных грибов и дцРНК, а также для создания штаммов энтомопатогенных грибов, продуцирующих интерферирующие РНК для подавления иммунитета хозяина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До настоящей работы антигрибной иммунный ответ КЖ изучался в контексте защиты, связанной с морфологическими и биохимическими свойствами кутикулы, параметрами клеточного иммунитета, а также с активностью фенолоксидаз, антиоксидантных и детоксицирующих ферментов. Нами впервые проведено исследование экспрессии ряда генов иммунного ответа этого вида насекомого в пространственно-временном и патоген-специфичном аспектах: в разных тканях (кутикула, гемоциты, жировое тело) и на разных этапах инфекций, вызванных тремя видами энтомопатогенных грибов (*B. bassiana*, *M. robertsii* и *C. fumosorosea*). Это позволило создать картину локального и системного иммунного ответа в разные периоды развития грибной инфекции. При этом главное внимание было уделено новым кандидатам иммунного ответа насекомых – R-лектинам. Установлено, что наиболее сильное повышение экспрессии генов иммунного ответа происходит на этапе инкапсуляции патогенов (72 часа после заражения). Однако и на этапе проникновения грибов через кутикулу (24 часа) наблюдается подъём экспрессии ряда генов в жировом теле и гемоцитах, в том числе генов R-лектинов и АМП. Это подтверждает тот факт, что системный иммунный ответ запускается уже на ранних стадиях проникновения патогена через кутикулу (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Zhang et al., 2020). При этом мы впервые показали, что у генов R-лектинов *LdRBLk* и *RBLn* значительно повышается экспрессия в тканях кутикулы, жирового

тела и гемоцитах в ответ на заражение разными видами грибов. Это свидетельствует в пользу их участия в антигрибном иммунном ответе КЖ.

В последующих экспериментах показано, что ген *LdRBLk* повышает экспрессию не только в ответ на грибные инфекции, но и в ответ на стрессовые воздействия, связанные с повреждениями кутикулы. Подобный эффект характерен и для других эффекторов иммунного ответа – АМП (Zhang et al., 2015; Liu et al., 2026) и может рассматриваться как неспецифическая реакция на стресс, которая может быть связана, в том числе, с активацией сигнального пути MAPK (Delaney et al., 2006). Поэтому дальнейшие исследования могут быть направлены на изучение связи между сигнальными компонентами MAPK и экспрессией *LdRBLk* и *RBLn* у КЖ.

Проведенный биоинформатический анализ показал, что R-лектины КЖ содержат один и тот же белковый домен и являются паралогами, произошедшими от общего белкового предка путём удвоения гена. Путём филогенетического анализа было установлено, что R-лектины КЖ являются ортологами β-лектинов, гликозил-гидролаз и токсинов растений, грибов и бактерий. При исследовании вторичной, третичной структуры *LdRBLk* и его лиганд-специфичности было установлено, что структура белка позволяет ему взаимодействовать с поверхностью клеточной стенки грибов по типу «ковёр» (Zhang et al., 2020; Manniello et al., 2021). При таком взаимодействии противогрибной пептид не интегрируется в клеточную стенку гриба, а образует «ковровый узор» на её поверхности, изменяет её форму и приводит к разрыву клеточной стенки. В пользу этой гипотезы свидетельствовали наши дальнейшие исследования *in vitro* с коммерчески доступным β-лектином токсина ризина из *R. communis* (RBL) и рекомбинантным лектином *LdRBLk*. Было обнаружено, что добавление RBL к культурам энтомопатогенных грибов *M. robertsii* и *B. bassiana* снижает прорастание конидий вплоть до полного ингибирования их роста. При добавлении обоих R-лектинов в культуральные среды были обнаружены «лопнувшие» споры, остатки клеточного содержимого и фрагменты разрушенных клеточных стенок, что и должно наблюдаться при разрушении пропагул грибов по механизму «ковёр» (Zhang et al., 2020; Manniello et al., 2021). Антигрибные свойства R-лектинов насекомых показаны нами впервые.

Исследования нокдауна генов методом РНК-интерференции позволили установить, что экспрессия генов *LdRBLk* и *RBLn* зависит от экспрессии генов транскрипционных факторов пути Toll *DorsalDif* и не зависит от экспрессии гена транскрипционного фактора пути JAK/STAT (*Stat*). В частности, нокдаун генов *DorsalDif1/DorsalDif2* достоверно понижал экспрессию генов *LdRBLk* и *RBLn* как в контроле, так и при грибной инфекции и приводил к повышению восприимчивости личинок жука к *B. bassiana*. Нокдаун непосредственно гена *LdRBLk* не вызывал снижения выживаемости личинок или изменений в чувствительности к грибной инфекции. Последнее может быть связано с компенсаторными эффектами,

связанными с изменением экспрессии паралогов *LdRBLk* или других эффекторов пути Toll. Интересным и важным эффектом было снижение уровня меланизации в ответ на грибную инфекцию у личинок с нокадауном *DorsalDif*×2. Последнее может свидетельствовать в пользу гипотезы о связи поздних компонентов пути Toll с фенолоксидазным каскадом и клеточным иммунитетом (Qiu et al., 1998). Вопрос о возможности участия пути IMD в регуляции генов R-лектинов КЖ пока остаётся открытым. Будущие исследования могут быть сосредоточены на более глубоком понимании регуляторных механизмов, определяющих участие исследуемых лектинов в системе иммуносигнальных путей, фенолоксидазного каскада и клеточного иммунитета жесткокрылых насекомых.

Результаты работы, взятые вместе, свидетельствуют о том, что рицин-подобные β-лектины (R-лектины) являются участниками антигрибного иммунного ответа КЖ и выступают в роли эффекторов, регуляторно связанных с иммуносигнальным путем Toll (Рис. 7). Полученные результаты могут быть применены для разработки новых методов регуляции численности КЖ на основе комбинированного применения энтомопатогенных микроорганизмов и РНК-технологий.

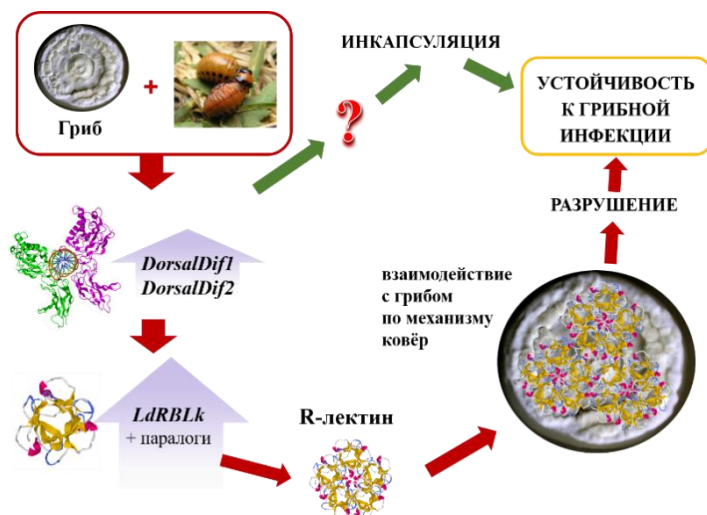


Рис. 7. Обобщённая схема работы R-лектинов в антигрибном иммунном ответе колорадского жука на примере лектина *LdRBLk*.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия генов рицин-подобных β -лектинов колорадского жука индуцируется в ответ на инфекции *Metarhizium robertsii*, *Beauveria bassiana* и *Cordyceps fumosorosea* в интегументах, жировом теле и гемоцитах вместе с другими эффекторами иммунного ответа – аттацином, холотрицином, тенецином и перлюцином. На этапе инкапсуляции патогенов регистрируется более высокая индукция экспрессии указанных генов по сравнению с этапом проникновения грибов через кутикулу.

2. Подъём экспрессии гена рицин-подобного β -лектина LdRBLk и других эффекторов иммунного ответа колорадского жука (аттацина, акалолептина, одорант-связывающего белка) происходит не только в ответ на грибные инфекции, но и в ответ на стрессы, связанные с нарушением целостности покровов тела.

3. Четыре гена рицин-подобных β -лектинов колорадского жука являются паралогами друг другу и гомологами таковых лектинов жесткокрылых, растений, грибов и бактерий. Предсказанная третичная структура рицин-подобного β -лектина колорадского жука LdRBLk указывает на возможность его взаимодействия с поверхностью клеточной стенки грибов по механизму «ковёр».

4. Рекомбинантный рицин-подобный β -лектин колорадского жука LdRBLk подавляет формирование ростовых трубок и склероциев энтомопатогенных грибов, а также приводит к разрушению их бластоспор и гиф *in vitro*.

5. Нокдаун гена фактора транскрипции сигнального пути JAK/STAT (*Stat*) не влияет на экспрессию генов рицин-подобных β -лектинов. Нокдаун генов транскрипционных факторов пути Toll (*DorsalDif*) приводит к снижению экспрессии не менее чем двух паралогов этих лектинов (*LdRBLk* и *RBLn*) и повышает восприимчивость личинок колорадского жука к грибу *Beauveria bassiana*.

6. Нокдаун генов транскрипционных факторов Toll-пути (*DorsalDif*) является перспективным подходом для разработки комбинированных препаратов против колорадского жука на основе интерферирующих РНК и энтомопатогенных грибов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Antonets, M. Nearly complete genome sequences of the first two identified Colorado potato beetle viruses / M. Antonets, S. Bodnev, U. Rotskaya [et al.] // Scientific Reports. 2024. Vol. 14. № 1. – P. 352.

2. Kryukov, V.Y. Divergent immune strategies of Colorado potato beetle larvae against the entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* and *Beauveria*

bassiana: a comparative transcriptomic analysis / V. Kryukov, M. Antonets, **U. Rotskaya** [et al.] // *Insect Molecular Biology* 2026. Vol. 35. № 3. – P.338-358.

3. Kryukov, V.Y. Expression of immunity- and stress-related genes during an intermolt period in the Colorado potato beetle / V.Y. Kryukov, **U.N. Rotskaya**, O.N. Yaroslavtseva [et al.] // *Insects*. 2022. Vol. 13. № 12. – P. 1168.

4. Kryukov, V.Y. Fungus *Metarhizium robertsii* and neurotoxic insecticide affect gut immunity and microbiota in Colorado potato beetles / V.Y. Kryukov, **U. N. Rotskaya**, O.N. Yaroslavtseva [et al.] // *Scientific Reports*. 2021. Vol. 11. № 1. – P. 1299.

5. **Rotskaya, U.N.** Identification of the Ricin-B-Lectin LdRBLk in the Colorado potato beetle and an analysis of its expression in response to fungal infections / U.N. Rotskaya, V.Y. Kryukov, E. Kosman [et al.] // *Journal of Fungi*. 2021. Vol. 7. № 5. – P. 364.

Материалы и тезисы конференций:

Роцкая, У.Н. Идентификация рицинового β -лектина LdRBLk у колорадского жука и анализ его экспрессии в ответ на грибную инфекцию / У.Н. Роцкая, В.Ю. Крюков, Е.С. Косман, М.В. Тюрин, В.В. Глухов // *Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования: материалы Всероссийской научной конференции, Пермь, 18–20 октября 2021 г.* – Пермь: ПГНИУ, 2021. – С. 127–129.

Роцкая, У.Н. Участие рицинового β -лектина LdRBLk в иммунном ответе колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) и анализ экспрессии его гена в ответ на грибную инфекцию / У.Н. Роцкая, В.Ю. Крюков, Е.С. Косман, М.В. Тюрин, В.В. Глухов // XVI съезд Русского энтомологического общества, Москва, 22–26 августа 2022 г.: тезисы докладов. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2022. – С. 87.

Роцкая, У.Н. Рицино-подобный β -лектин LdRBLk колорадского жука *L. decemlineata* и его влияние на экспрессию генов энтомопатогенного гриба *M. robertsii* / У.Н. Роцкая, В.Ю. Крюков, Е.С. Косман, М.В. Тюрин, В.В. Глухов // VII съезд Паразитологического общества: итоги и актуальные задачи: тезисы докладов, Петрозаводск, 16–20 октября 2023 г. – Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2023. – С. 301–302.

Роцкая, У.Н. Экспрессия генов иммунного ответа у колорадского жука в ответ на грибные инфекции, перспективы РНК-интерференции генов иммуно-сигнальных путей / У.Н. Роцкая, Ю.А. Носков, Е.Э. Мазина, Е.С. Косман, М.Е. Антонец, Д.В. Антонец, В.Ю. Крюков // IV Всероссийская конференция «Высокопроизводительное секвенирование в геномике», Новосибирск, 22–26 июня 2025 г. – Новосибирск: Академиздат, 2025. – С. 75.