

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ СИСТЕМАТИКИ И ЭКОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

УДК 592

Роцкая Ульяна Николаевна

**Антигрибной иммунный ответ колорадского жука
Leptinotarsa decemlineata (Say): роль рицин-подобных β -лектинов**

1.5.14 – энтомология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель –
доктор биологических наук
Вадим Юрьевич Крюков

Новосибирск – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Клеточный иммунитет	13
1.2. Гуморальный иммунитет	14
1.2.1. Фенолоксидазный каскад	14
1.2.2. Активация иммунного ответа насекомых	15
1.3. Иммуносигнальные пути и механизмы их действия	16
1.3.1. Toll путь	17
1.3.2. IMD путь	18
1.3.3. Кроссрегуляция Toll и IMD путей	19
1.3.4. JAK/STAT путь	19
1.4. Антимикробные пептиды и белки насекомых	21
1.4.1. АМП насекомых проявляющие антигрибную активность	23
1.4.2. АМП и другие эффекторы иммунного ответа колорадского жука	24
1.4.3. Механизмы действия АМП	26
1.4.4. Особенности строения клеточной стенки грибов	29
1.4.5. Внутриклеточные мишени для АМП	30
1.5. Лектины, участвующие в иммунном ответе	31
1.5.1. Лектины R-типа	32
1.5.2. Лектины R-типа у беспозвоночных	37
1.5.3. Лектины R-типа у насекомых отряда Coleoptera	38
1.6. Одорант-связывающие белки	38
1.7. Белки теплового шока	42
1.8. Белки антиоксидантной защиты	40
1.9. Регуляция экспрессии генов АМП на примере жуков Tenebrionidae и <i>D. melanogaster</i>	41
1.10. Исследования и картирование генома и транскриптома колорадского жука; гены иммунного ответа колорадского жука	44
1.11. РНК-интерференция	45
1.11.1. РНК-интерференция у колорадского жука	48
1.12. Заключение обзора литературы	49

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
2.1. Грибы и насекомые	51
2.2. Инфицирование разными видами энтомопатогенных грибов и экспрессия генов иммунного ответа в тканях жирового тела, кутикулы и гемоцитов на разных этапах инфекции	51
2.2.1. Схема эксперимента	51
2.2.2 Отбор образцов тканей	52
2.2.3 Выделение суммарной РНК	53
2.2.4 ДНКазная обработка суммарной РНК	53
2.2.5 Синтез кДНК	54
2.2.6 Количественная ПЦР (кПЦР)	54
2.3. Изменение экспрессии исследуемых генов при грибной инфекции и различных видах стресса	55
2.3.1. Схема эксперимента	55
2.3.2 кПЦР	56
2.4. Биоинформатический анализ R-лектинов колорадского жука	57
2.4.1. Анализ первичной нуклеотидной и аминокислотной последовательностей	57
2.4.2. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей R-лектинов (LdRBLs)	58
2.5. Влияние β -лектина рицинового токсина (RBL) из <i>R. communis</i> на прорастание конидий <i>M. robertsii</i> и <i>B. bassiana</i>	60
2.5.1. Дозо-зависимое влияние RBL <i>R. communis</i> на прорастание конидий <i>M. robertsii</i> и <i>B. bassiana</i>	60
2.5.2. Световая микроскопия конидий <i>M. robertsii</i> при культивировании с RBL <i>R. communis</i>	60
2.5.3. Формирование склероциев <i>M. robertsii</i> при культивировании с RBL <i>R. communis</i>	61
2.5.4. Электронная микроскопия гифальных тел <i>M. robertsii</i> при культивировании с RBL <i>R. communis</i>	61
2.6. Влияние рекомбинантного R-лектина LdRBLk на конидии и бластоспоры <i>M. robertsii</i>	62

2.6.1. Синтез рекомбинантного R-лектина LdRBLk в культуре клеток насекомых	62
2.6.2. Влияние рекомбинантного R-лектина LdRBLk на прорастание конидий <i>M. robertsii</i>	63
2.6.3. Оценка структурных изменений клеточной стенки гриба <i>M. robertsii</i> методом атомно-силовой микроскопии	64
2.7. РНК-интерференция целевых генов: влияние на выживаемость личинок, восприимчивость к грибной инфекции и экспрессию генов иммунного ответа	65
2.7.1. Подбор и синтез целевых дцРНК	65
2.7.2. Нарботка пцр-продукта по праймерам с последовательностью промотора T7	66
2.7.3. Очистка пцр-продукта из агарозного геля	67
2.7.4. Синтез дцРНК на матрице ПЦР-продуктов	67
2.7.5. Очистка дцРНК на колонках	68
2.7.6. Инъекции дцРНК и заражение грибным патогеном личинок колорадского жука	68
2.7.7 кПЦР	69
2.8. Статистика	69
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	71
3.1. Экспрессия генов иммунного ответа в тканях кутикулы, жирового тела и гемоцитах на разных этапах развития грибных инфекций	71
3.2. Экспрессия гена <i>LdRBLk</i> в системе иммунного ответа после стрессовых воздействий и топикального заражения грибом	79
3.3. Анализ структуры LdRBLk	85
3.3.1. Анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей.....	85
3.3.2. Филогенетический анализ LdRBLk	92
3.4 Влияние гомолога β -лектина рицина (RBL) и рекомбинантного LdRBLk на энтомопатогенные грибы <i>in vitro</i>	98
3.4.1. Влияние β -лектина рицина (RBL) из <i>R. communis</i> на прорастание конидий <i>M. robertsii</i> и <i>B. bassiana</i>	98

3.4.2. Влияние рекомбинантного R-лектина LdRBLk на прорастание конидий <i>M. robertsii</i>	102
3.4.3. Оценка структурных изменений бластоспор гриба <i>M. robertsii</i> при культивировании с рекомбинантным R-лектином LdRBLk методом атомно-силовой микроскопии	103
3.5. Оценка влияния нокдауна генов <i>LdRBLk</i> , <i>Stat</i> и <i>DorsalDif</i> на восприимчивость личинок к грибной инфекции и регуляцию генов иммунного ответа	108
3.5.1. Влияние дцРНК <i>Stat</i> на восприимчивость личинок к грибной инфекции и экспрессию генов иммунного ответа	108
3.5.2. Влияние дцРНК <i>DorsalDif1/DorsalDif2</i> на экспрессию генов иммунного ответа и восприимчивость к <i>B. bassiana</i>	110
3.5.3. Влияние <i>dsLdRBLk</i> на выживаемость и экспрессию генов иммунного ответа при грибной инфекции <i>B. bassiana</i>	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
ВЫВОДЫ	123
СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	124
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	126
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	128
ПРИЛОЖЕНИЕ	159

ВВЕДЕНИЕ

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 рицин-подобные β -лектины. На данный момент R-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-мотива, 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 паралофов 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 трёх) 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Насекомые представляют собой самый многочисленный класс живых организмов, существующий на нашей планете более 400 млн лет. Этим организмам удалось адаптироваться к постоянным изменениям абиотических и биотических факторов, в том числе выработать защитные механизмы от широкого спектра патогенов (Hillyer, 2016; Vallet-Gely et al., 2008; Manniello et al., 2021). Их способность к противостоянию патогенам определяется их иммунной системой, основанной на врождённом иммунном ответе, который позволяет быстро реагировать на вторжение чужеродных организмов.

Первый уровень защиты насекомых от проникновения патогенных микроорганизмов в полость тела представлен физическими барьерами: кутикулой, кишечной стенкой, включающей перитрофическую мембрану и стенки трахей. Иммунный ответ запускается уже при контакте чужеродных организмов с этими барьерами: при адгезии патогенов к кутикуле или при попадании патогена в просвет кишечника (Tsakas and Marmaras, 2010; Lu and Leger, 2016; Pesch et al., 2016). Врождённая иммунная система существует у всех организмов и включает в себя клеточный и гуморальный ответы. У насекомых клеточные иммунные реакции осуществляются клеточным компонентом гемолимфы – гемоцитами, отвечающими за фагоцитоз, нодуляцию и инкапсуляцию вторгшихся патогенов. При этом гемоциты, клетки жирового тела и других тканей также вовлечены в механизмы гуморального ответа, который включает синтез антимикробных пептидов и белков (АМП), ферментативные каскады, регулирующие коагуляцию и меланизацию, а также продукцию активированных кислородных метаболитов (АКМ) и реактивных форм азота (РФА) (Sheehan et al., 2020). Антиоксидантная и детоксицирующая системы направлены на инактивацию последних, а также токсинов самих патогенов и метаболитов, образующихся при повреждении тканей (Chaitanya et al., 2016). Чёткое разделение между гуморальным и клеточным иммунным ответом является скорее условным, чем функциональным; многие гуморальные факторы регулируют активность гемоцитов и, в то же время,

гемоциты являются источником многих молекул, участвующих в гуморальном ответе. Более того, они часто используют одни и те же пути передачи сигнала, даже если они активируются разными стимулами (Muhammad et al., 2024; Rosendo et al., 2021).

1.1. Клеточный иммунитет

У большинства представителей насекомых гемоциты дифференцируются на гранулоциты, плазмоциты, сферулоциты и эноцитоиды (Strand, 2008; Lavine and Strand, 2002). У *L. decemlineata* иммунокомпетентные клетки – плазмоциты и гранулоциты могут составлять до 88% циркулирующих гемоцитов (Ebrahimi et al., 2014). Эти типы гемоцитов проявляют способность к адгезии к различным инвайдерам, участвуют в продукции АМП, а также в высвобождении компонентов внеклеточного матрикса (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Сферулоциты несут небольшое количество крупных включений, сферул, а эноцитоиды содержат предшественников ФО каскада, при этом оба этих типа не обладают адгезивной способностью (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Фагоцитоз — это процесс, включающий распознавание и поглощение гемоцитами чужеродных агентов посредством модификации цитоскелета с последующей транспортировкой фагоцитированного материала в фагосомы, где он полностью деградирует благодаря действию гидролаз, АКМ и оксида азота (Lavine and Strand, 2002). У большинства отрядов насекомых за фагоцитоз отвечают гранулоциты и плазмоциты, в то время как у *Drosophila melanogaster* Meigen эту роль выполняют только плазмоциты (Strand, 2008; Lavine and Strand, 2002).

В том случае, когда большое количество мелких «мишеней» не может быть фагоцитировано гемоцитами, активируется процесс нодуляции. В этом процессе несколько типов гемоцитов распознают и окружают инородные объекты, образуя комплексы, которые могут подвергаться или не подвергаться меланизации (Satyavathi et al., 2014). В случае, если агенты вторжения слишком велики для фагоцитирования, например, гифальные тела грибов, простейшие или нематоды,

гемоциты адгезируются к их поверхностям, образуя капсулу, состоящую из нескольких клеточных слоев, которые в большинстве случаев подвергаются меланизации. Внутри капсулы патогенный организм может быть инактивирован вследствие асфиксии и за счёт выработки цитотоксических свободных радикалов (Lavine and Strand, 2002; Dolezal, 2023). Гранулоциты и плазмоциты участвуют в формировании капсулы при инкапсуляции у *Lepidoptera* (Eleftherianos et al., 2021), в то время как у *D. melanogaster* эту роль играют плазмоциты и ламеллоциты (Satyavathi et al., 2014).

1.2. Гуморальный иммунитет

1.2.1. Фенолоксидазный каскад

Среди гуморальных иммунных реакций у насекомых важную роль играет фенолоксидазный каскад, направленный на выработку меланина и детально описанный в нескольких обзорах (Nappi and Christensen, 2005; Eleftherianos et al., 2011; Sugumaran and Barek, 2016; Marieshwari et al., 2023). Он участвует как в защите от патогенов, так и в репарации кутикулярных повреждений для предотвращения потери гемолимфы (Tang, 2009). При инфекции или повреждениях тканей насекомых происходит распознавание специфических молекулярных паттернов на поверхности патогена (PAMP) или паттернов, ассоциированных с повреждениями (DAMP) (Nakhleh et al., 2017). Кроме того, PAMP и/или DAMP активируют каскад сериновых протеаз, которые в нормальном состоянии находятся под контролем их ингибиторов – серпинов. Активация каскада сериновых протеиназ приводит к активации фенолоксидазы (ФО) из её предшественника – профенолоксидазы (проФО). Такие сложные процессы взаимодействия активаторов и ингибиторов обусловлены тем, что активация ФО сопровождается образованием цитотоксичных промежуточных продуктов меланогенеза, включая хиноны, а также АКМ и РФА). Активированная ФО запускает синтез меланина из его предшественников (Sugumaran and Barek, 2016; Marieshwari et al., 2023).

Многие данные свидетельствуют о том, что проФО синтезируется и накапливается в гемоцитах и, при необходимости, высвобождается в результате литического процесса, который не обязательно приводит к гибели клетки (Cerenius et al., 2008). Другие исследования показали, что проФО локализуется на поверхности гемоцитов. Такая локализация может способствовать отложению меланина непосредственно на чужеродном агенте (Ling and Yu, 2005; Pascale et al., 2014). При синтезе меланина из тирозина образуются токсичные промежуточные метаболиты, системная диффузия которых была бы чрезвычайно вредна для насекомого, поэтому этот процесс локализован в специализированных органеллах – меланосомах, что необходимо для выживания насекомого во время активации меланогенеза (Falabella et al., 2012). Также эти токсичные промежуточные продукты, такие как хиноны и индолы, отдельно или в сочетании с АКМ и РФА, участвуют в инактивации патогена (Nappi and Christensen, 2005). Кроме того, сам меланин может замедлять рост патогенов, в том числе и энтомопатогенных грибов, что показано в работах Р. Леджера (Leger, 1988).

1.2.2. Активация иммунного ответа насекомых

Запуск иммунного ответа насекомых происходит при распознавании специфических консервативных молекулярных структур чужеродного агента, расположенных на поверхности клеточной стенки патогена и определяемых как PAMP. Кроме того, DAMP (например, протеазы патогенов или соединения, образующихся при повреждении тканей хозяина) вызывают запуск иммунных каскадов.

Примерами PAMP являются флагеллин, липотейхоевая кислота, пептидогликаны грамположительных бактерий, липополисахариды грамотрицательных бактерий и β -1,3-глюканы грибов (Muhammad et al., 2024). PAMP распознаются специфическими рецепторами – паттерн-распознающими рецепторами (PRRs). Иммунолектины (лектины С-типа), пептидогликан-распознающие протеины (PGRP), белки, связывающие грамотрицательные бактерии (GNBP), β -1,3-глюкан-распознающие протеины (β GRP) – это соединения,

циркулирующие в гемолимфе и способные распознавать специфические антигены (Tsakas and Marmaras, 2010; Muhammad et al., 2024).

К лектинам С-типа относятся коллектины, селектины, эндоцитозные рецепторы и протеогликаны, некоторые из которых являются секретируемыми (свободно плавающими в лимфе), а другие – трансмембранными белками. Они часто олигомеризуются, что увеличивает их аффинность к многовалентным лигандам и способствует усилению распознавания антигенов патогенов паттерн-распознающими рецепторами (PRRs). За счёт углевод-распознающих доменов (CRD) они взаимодействуют с углеводными структурами поверхности патогенов, включая компоненты клеточной стенки (Cummings et al., 2022).

Пептидогликан распознающий белок LC (PGRP-LC) и интегрины представляют собой рецепторы, расположенные на поверхности иммунных клеток, которые распознают поверхностные компоненты грамотрицательных бактерий и аминокислотный мотив RGD (название мотива по однобуквенной классификации аминокислот аргинин-глицин-аспарагиновая кислота) (Hillyer, 2016; Tsakas and Marmaras, 2010). Этот мотив содержится в белках внеклеточного матрикса и в некоторых растворимых белках, таких как коллаген, фибронектин и ламинин. Связывание интегринов с мотивом RGD представляет собой первый шаг для распознавания чужеродных агентов. Связывание рецепторов с PAMP приводит к активации клеточных и/или гуморальных иммунных реакций. Сложные каскады гуморальных иммунных реакций завершаются выработкой антимикробных пептидов и белков (АМП), активацией профенолоксидаз, образованием АКМ и РФА, синтезом белков, связанных со стресс-ответом, репарацией повреждений, а также ряда других соединений, в том числе и иммунолектинов (Nappi and Christensen, 2005; Tsakas and Marmaras, 2010; Muhammad et al., 2024). Продукция АМП регулируется по механизмам иммуносигнальных путей, описанных ниже.

1.3. Иммуносигнальные пути и механизмы их действия

После обнаружения чужеродных микроорганизмов паттерн-распознающими рецепторами (PRRs) активируется несколько сигнальных путей. У насекомых

обычно выделяют от трёх до семи иммуносигнальных путей, основными из которых являются Toll, IMD с ветвью JNK/MAPKp38 и JAK/STAT (Valanne et al., 2011; Kleino and Silverman, 2014; Myllymaki and Ramet, 2014; Manniello et al., 2021). PAMP грамположительных бактерий и грибов индуцируют Toll путь (Valanne et al., 2011), PAMP грамотрицательных бактерий индуцируют IMD путь (Alejandro et al., 2022), а JAK/STAT путь активируется цитокинами, которые высвобождаются из гемоцитов в ответ на широкий спектр воздействий (Houtz et al., 2019) (рис. 1). Активация сигнальных путей, участвующих в гуморальном иммунном ответе, приводит к синтезу и высвобождению антимикробных пептидов, нацеленных на иницирующий антиген (Lemaitre and Hoffmann, 2007), а также на активацию процессов инкапсуляции и меланизации.

1.3.1. Toll путь

При взаимодействии PAMP патогенов с β GRP, PGRP (PGRP-SA), а также GNBPs (белки, связывающие грамотрицательные бактерии) насекомых запускается каскад сериновых протеаз. Он активирует переход проФО в ФО и приводит к протеолитическому расщеплению предшественника Spätzle с образованием активного лиганда Toll-рецептора. Полипептиды Spätzle активируют трансмембранные Toll-рецепторы, запускающие каскад внутриклеточной передачи сигнала Toll пути (рис. 1) (Shia et al., 2009; Sun et al., 2017; Cherry and Silverman, 2006; Mishima et al., 2009). В частности, в случае инфекции, вызванной грамположительными бактериями, активация Toll опосредована пептидогликан-распознающими белками (PGRPs), реагирующими на пептидогликаны Lys-типа, тогда как в случае грибной инфекции активация Toll опосредована β GRP, реагирующими на бета-1,3-гликаны (Mishima et al., 2009, Wang and Jiang, 2006). Когда полипептид Spätzle связывает Toll-рецептор, начинается димеризация внутрицитоплазматических доменов TIR (toll-interleukin receptor), что приводит к связыванию адапторного белка MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) (Valanne et al., 2011). Этот белок связывает адаптерный белок Tube, который рекрутирует протеинкиназу Pelle для своего автофосфорилирования,

фосфорилирования и деградации белка Cactus. Белок Cactus является ингибитором транскрипционных факторов Toll пути, которые являются представителями семейства NFkB/Rel белков, к которым у разных видов насекомых относятся Dif, Dorsal, DorsalDif или Rel1 (у комаров и москитов). Они содержат домен RHD (Rel homology domain) и домен NFkB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Kumar et al., 2018; Wang and Jiang, 2006). Эти транскрипционные факторы транслицируются в ядро, где они активируют транскрипцию таких АМП, как дрозомин и мечниковин (Imler and Hoffmann, 2002), активных по отношению к грамположительным бактериям и грибам.

Следует отметить, что Toll путь активируется не только PAMP, но и DAMP, такими как внеклеточные субтилизин-подобные протеазы грибов, которые активируют сериновые протеазы Toll-каскада (Valanne et al., 2011). Toll путь тесно связан с ФО-каскадом через каскад сериновых протеаз и их ингибиторов – серпинов (рис. 1) (Ayaz et al., 2025; Muhammad et al., 2024).

1.3.2. IMD путь

Передача сигнала от PAMP грамотрицательных бактерий происходит с помощью пути IMD. Этот сигнальный путь активируется, когда рецепторы PGRP-LC связывают мезо-диаминопимелиновую кислоту пептидогликана DAP-типа (рис. 1). Белок IMD связывается с Fas-ассоциированным белком, содержащим домен смерти (Death Domain) (FADD), а каспаза DREDD (FADD-death-related ced-3/Nedd2-like protein) рекрутируется для расщепления белка IMD, который затем активируется K63-убиквитинированием (Kleino and Silverman, 2014). K63-полиубиквитиновые цепи рекрутируют TAK1 (трансформирующий фактор роста бета (TGF- β)-активируемая киназа 1), который активирует комплекс IKK, участвующий в фосфорилировании NFkB-подобного транскрипционного фактора Relish. После расщепления и фосфорилирования Relish достигает ядра, где активирует транскрипцию специфических АМП, таких как диптерицин, аттацин, мечниковин (рис. 1), активных против грамотрицательных бактерий (Erturk-Hasdemir et al., 2009). У комаров и москитов транскрипционный фактор IMD пути

имеет то же доменное строение, что и Relish, но называется Rel2 (Kumar et al., 2018).

Ветвью IMD пути является сигнальный каскад JNK/MAPKp38, связанный с IMD через сигнальные компоненты TAK1 и TAB2. Путь JNK/MAPKp38 связан со стресс-ответом, пролиферацией гемоцитов, репарацией повреждений, автофагией, окислительно-восстановительными процессами (Krautz et al., 2014). В частности, IMD путь связан с системой двойной оксидазы (DUOX), вырабатывающей супероксид и перекись водорода в просвет кишечника, тем самым обеспечивая защиту от кишечных патогенов и баланс микробиоты (Xiao et al., 2017).

1.3.3. Кроссрегуляция Toll и IMD путей

Активация путей Toll или IMD любым из вышеуказанных механизмов приводит к устойчивой активации транскрипционных факторов семейства NFkB/Rel, как показано на дрозофиле (Ganesan et al., 2011).

Транскрипционные факторы Toll-пути (DorsalDif) и IMD-пути (Relish) имеют похожее строение. Оба содержат NFkB-домен, семейства RHD (Rel-гомологичные домены). Однако у Relish также есть дополнительные домены: ANK (анкириновые повторы) и DD-домен (Death Domain), участвующий в сигнальных путях апоптоза и иммунитета. Эксперименты с РНК-интерференцией показали, что взаимодействие различных факторов транскрипции, несущих NFkB-домен, вызывает синергизм Toll и IMD путей и одновременный синтез дрозомидина, диптерицина и аттацина А (Tanji et al., 2007).

1.3.4. JAK/STAT путь

В сигнальном пути JAK/STAT основными компонентами являются янус-киназа (Janus kinase Hopscotch (JAK)) – внутриклеточная нерецепторная киназа и сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции (STAT). Янус-киназа активируется цитокиновым рецептором Domeless после его связывания с лигандом – цитокином: происходит фосфорилирование специфических

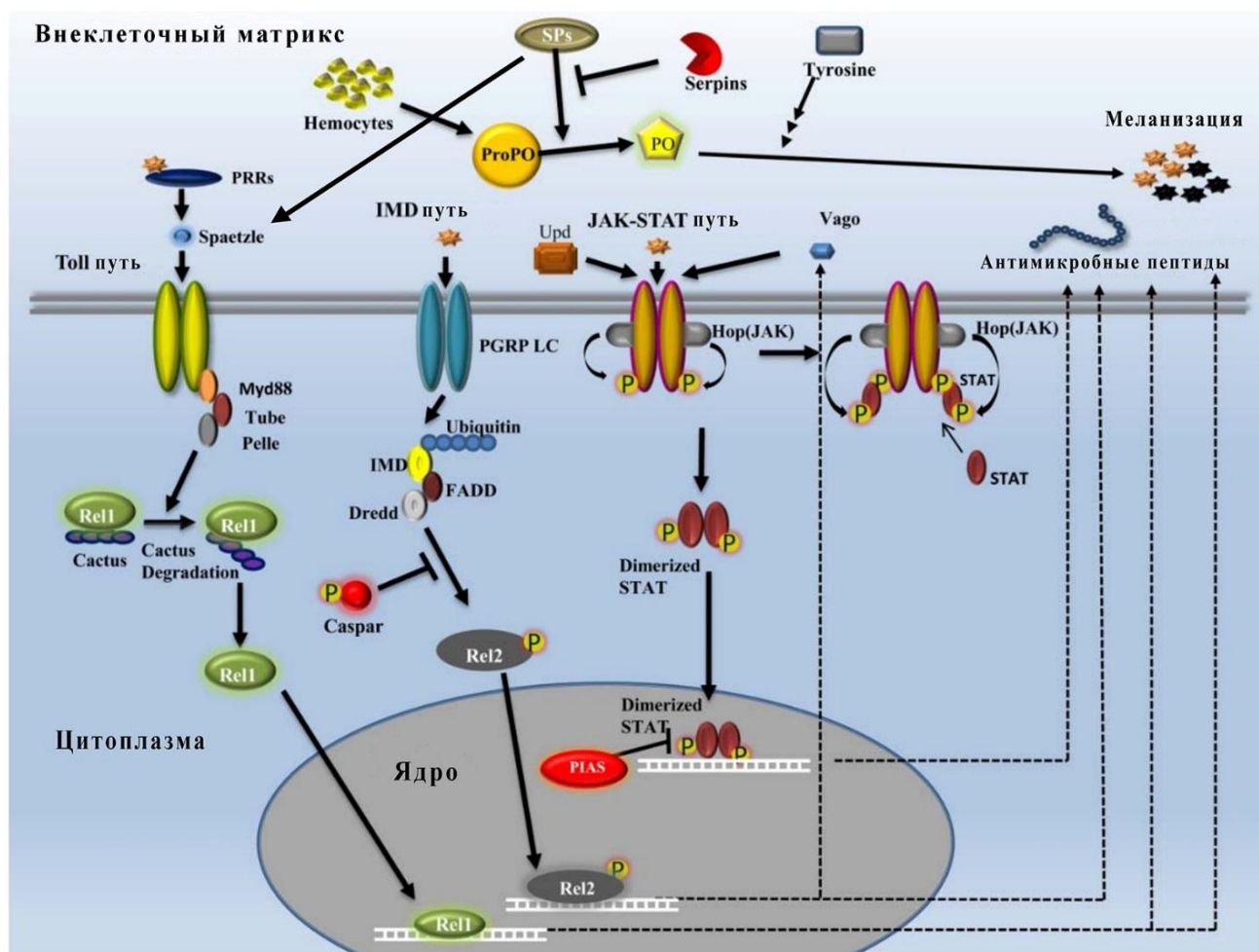


Рис. 1. Сигнальные пути врожденного иммунитета насекомых на примере комаров – москитов по Kumar et al. (2018) с дополнениями. PRRs – паттерн распознающие рецепторы, ProPO – профенолоксидаза, PO – фенолоксидаза, SPs – сериновые протеиназы, PGRP LC – пептидогликан распознающие протеины LC-типа, Hop(JAK) – янус-киназа, Rel1 – транскрипционный фактор Toll пути, Rel2 – транскрипционный фактор IMD пути, STAT – транскрипционный фактор JAK/STAT пути.

тирозиновых остатков на цитоплазматической части рецептора с Янус-киназой, которые затем связываются с молекулами STAT (Stokes et al., 2015; O'Shea and Plenge, 2012) (рис. 1). STAT фосфорилируются янус-киназами (JAKs) по тирозиновым остаткам, что приводит к образованию димеров из фосфорилированных STAT и их транслокации в ядро, где они связывают промоторы своих генов-мишеней (Kiu and Nicholson, 2012). Активация JAK/STAT

пути в ответ на вирусные, бактериальные или грибные инфекции приводит к индукции синтеза разнообразных интерлейкинов (Geng et al., 2016).

Активация сигнального пути JAK/STAT в гемоцитах необходима для их повышенной пролиферации в ответ на опухоли и раны (Pastor-Pareja et al., 2008). Stat92E (один из транскрипционных факторов STAT) у дрозофилы влияет на окончательную дифференцировку гемоцитов в плазмоциты, гиперпролиферацию циркулирующих плазмоцитов и дифференцировку ламеллоцитов (Morin-Poulard et al., 2013). Таким образом, поддержание гомеостатического баланса между пролиферацией и дифференцировкой гемоцитов тщательно контролируется на уровне сигнального пути JAK/STAT, что влияет на клеточный иммунитет и процессы, связанные с ним (фагоцитоз, инкапсуляция) (Bang et al., 2019).

1.4. Антимикробные пептиды и белки насекомых

К настоящему времени в базе данных антимикробных пептидов (<http://aps.unmc.edu/AP/>) идентифицировано 3306 АМП из различных царств, в том числе 397 АМП насекомых, 410 бактериальных АМП (бактериоцины), 29 АМП грибов, 268 АМП растений и 397 АМП млекопитающих.

Необходимо отметить, что «антимикробные пептиды» и «антибактериальные пептиды» – это устоявшееся выражение и часто так называют не только пептиды (содержащие до 50 аминокислотных остатков), но и белки, проявляющие антимикробную активность. Например, акалолептин А, выделенный из жука-усача *Acalolepta luxuriosa* Bates, состоит из 423 аминокислотных остатков, но в работах авторов, впервые охарактеризовавших его, он именуется антимикробным пептидом (Imamura et al., 1999; 2009). В работе Баландина и Овчинниковой (2016) аббревиатура «АМП» расшифровывается как «антимикробные пептиды и белки». В нашей работе мы придерживаемся такого же определения.

АМП условно можно разделить на антибактериальные и антигрибные, активные соответственно либо против бактерий, либо против дрожжеподобных и мицелиальных грибов. Показано, что ряд АМП проявляют как антибактериальную,

так и антигрибную активность, что будет рассмотрено далее на примерах (Efimova et al., 2018; Xu et al., 2012; Mrinal and Nagaraju, 2008).

В организмах можно найти АМП меньшего или большего размера, однако большая их часть представляет собой небольшие молекулы, аминокислотный состав которых варьирует от 12 до 50 аминокислот (Yi et al., 2014). АМП участвуют в нескольких процессах, связанных с защитой организма: связывание и нейтрализация эндотоксинов, модуляция иммунного ответа на инфекцию и уничтожение патогенов (Brogden, 2005). Помимо антибактериальной, противогрибной активности АМП могут демонстрировать противовирусные и противоопухолевые свойства (Jin and Weinberg, 2019; Tonk et al., 2016; Zasloff, 2002). Первый АМП насекомых, цекропин, был идентифицирован в 1980 году в куколках бабочки *Hyalophora cecropia* (L.) (Hultmark et al., 1980; Steiner et al., 1981). В последние несколько лет количество идентифицированных пептидов насекомых значительно увеличилось благодаря опубликованным данным о геномах, транскриптомах и протеомах.

Большинство АМП насекомых являются катионными молекулами, благодаря присутствию основных остатков, обладающих антибактериальной активностью. В соответствии с их аминокислотными последовательностями и структурами, АМП можно разделить на четыре группы: цистеин-богатые пептиды (например, дефензины), α -спиральные пептиды (например, цекропины), богатые глицином (Gly) пептиды (например, аттацины) и пролин-богатые пептиды (например, дрозотины) (Bulet and Stocklin, 2005; Makarova et al., 2018). В то же время Баландин и Овчинникова (2016) выделяют три основных класса АМП: 1) цистеинсодержащие пептиды, стабилизированные внутримолекулярными дисульфидными связями; 2) линейные α -спиральные пептиды; 3) линейные пептиды, обогащенные остатками определенных аминокислот; и дополнительный четвёртый класс - АМП смешанного типа, содержащие домены с различающейся структурой.

Количество АМП у насекомых может сильно различаться у разных видов. Например, 57 предположительно активных белков были идентифицированы у

двукрылых *Hermetia illucens* (L.), в то время как у тлей было выявлено всего несколько АМП (Gerardo et al., 2010; Moretta et al., 2020; Manniello et al., 2021).

1.4.1. АМП насекомых проявляющие антигрибную активность

Так как в нашей работе рассматриваются аспекты антигрибного иммунного ответа, то далее приведены примеры АМП, обладающих антигрибной (фунгицидной) активностью против дрожжеподобных и мицелиальных грибов.

Цекропины – линейные α -спиральные АМП насекомых, связанные с обоими сигнальными путями Toll и IMD (Kanost et al., 2004; Nesa et al., 2020). Было показано, что некоторые цекропины могут проявлять (1) фунгицидную активность, (2) низкую токсичность против клеток млекопитающих и (3) слабый или отсутствующий в некоторых случаях гемолитический эффект в отношении эритроцитов млекопитающих (Andra et al., 2001). Цекропин А проявляет фунгицидную активность по отношению к энтомопатогенному грибу *Beauveria bassiana* в тестах *in vitro*, а также *in vivo* в личинках тутового шелкопряда *Bombyx mori* (L.) (Lu et al., 2016).

Дрозомин — это индуцируемый противогрибковый пептид из 44 аминокислотных остатков, содержащий цистеин-стабилизированные альфа-спирали и бета-листы, выделенный из *D. melanogaster* (Fehlbaum et al., 1994). Дрозомин обладает узким антимикробным спектром и активен только против некоторых нитевидных грибов. Его экспрессия в жировом теле регулируется по Toll-пути, а в дыхательных путях контролируется IMD-путём (Zhang and Zhu, 2009).

Галлеримицин — дефензиноподобный пептид, идентифицированный в большой восковой моли *Galleria mellonella* (L.) в 2003 году (Schuhmann et al., 2003). Аминокислотная последовательность галлеримицина демонстрирует сходство с АМП дрозоминином из *D. melanogaster* и гелиомицином из *H. virescens*. Рекомбинантный пептид из 76 аминокислот был активен против энтомопатогенного гриба *M. anisopliae*, но не против дрожжей, грамотрицательных и грамположительных бактерий (Schuhmann et al., 2003).

Из гемолимфы личинок жука *Tenebrio molitor* L. выделен Тенецин-3 — глицин-богатый антигрибной белок, ингибирующий рост грибов *B. bassiana* (Maistrou et al., 2018) и *Candida albicans* (Lee et al., 1999) *in vitro*. В гемолимфе иммунизированных личинок жука *Holotrichia diomphalia* (Bates) были обнаружены глицин- и гистидин-богатые антибактериальные белки, названные голотрицином-1 и голотрицином-3 (Lee et al., 1999). В базе белков UniProt указано, что голотрицин-3 обладает активностью против грибов *C. albicans*.

Тауматин-подобные белки, изначально охарактеризованные как антигрибные белки бобовых растений, были найдены у насекомых. Для тепличной белокрылки *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) показано участие тауматин-подобного белка TvTLP в антигрибном ответе на инфекцию *B. bassiana* и *M. robertsii* за счёт проявления β -1,3-глюканазной активности (Hu et al., 2025).

Пролин-богатый иммуноиндуцибельный линейный пептид, названный мечниковин, был идентифицирован у *D. melanogaster* Е. Левашиной с соавторами (Levashina et al., 1995). Этот пептид проявляет активность в отношении грамположительных бактерий и грибов, в том числе подавляет рост *Metarhizium in vitro* и ингибирует продукцию металлопротеиназ у этого гриба (Mukherjee and Vilcinskis, 2018). Мечниковин нацелен на железо-серную субъединицу (SDHB) сукцинат-коэнзим Q-редуктазы и взаимодействует с грибным ферментом (1,3)-глюканозилтрансферазой Gell (FgBGT), который участвует в синтезе клеточной стенки грибов (Moghaddam et al., 2017).

1.4.2. АМП и другие эффекторы иммунного ответа колорадского жука

У колорадского жука присутствуют все основные компоненты сигнальных путей Toll, IMD, MAPK, JAK/STAT, гены рецепторов PGRP и bGRP, C- и R-лектинов и галектинов (Wilhelm et al., 2025). Среди генов эффекторов детектированы АМП аттацин (6 паралогов), акалолептин (1 паралог), тенецин-3 (1 паралог),

Таблица 2. АМП колорадского жука согласно базам NCBI (Ldec_3.0 annotation) и атласу экспрессии генов колорадского жука (<https://cpb-atlas.uni-mainz.de/>, Ldec_2.0 annotation). G⁻ – грамотрицательные бактерии, G⁺ – грамположительные бактерии, F – грибы (активность дана по Balandin and Ovchinnikova, 2016; Yao et al., 2024; Brandazza et al., 2004).

№	название АМП <i>L. decemlineata</i>	Номер гена, Ldec_3.0 annotation	Активность
1	Attacin-84	LOC111508698	G ⁻
2	attacin-B-like-56	LOC111512704	G ⁻
3	Attacin-86	LOC111514444	G ⁻
4	Attacin-68	LOC111512714	G ⁻
5	Attacin-44	LOC111512695	G ⁻
6	Attacin-34	LOC111512686	G ⁻
7	Acaloleptin-17; Coleopteracin	LOC111517834	G ⁻ , G ⁺
8	tenecin-3-like	LOC111515395	F, G ⁺
9	holotricin-3-like	LOC111505707	F, G ⁺
10	holotricin-3-like	LOC111516329	F, G ⁺
11	perlucin-like protein	LOC111513833	G ⁻ , G ⁺ , F
12	perlucin-like	LOC111509537	G ⁻ , G ⁺ , F
13	perlucin-like	LOC111510518	G ⁻ , G ⁺ , F
14	perlucin-like	LOC111513832	G ⁻ , G ⁺ , F
15	thaumatin-like protein 1	LOC111502336	F
16	thaumatin-like	LOC111506216	F
17	thaumatin-like	LOC111506218	F
18	thaumatin-like	LOC111515255	F
19	lysozyme-like	LOC111504439	G ⁻ , G ⁺
20	lysozyme-like	LOC111513985	G ⁻ , G ⁺
21	lysozyme-like	LOC111516837	G ⁻ , G ⁺
22	lysozyme-like	LOC111515531	G ⁻ , G ⁺

холотрицин-3 (2 паралога), перлюцин (4 паралога), тауматин (4 паралога) и лизоцим (4 паралога) (Таблица 2), а также гены профенолоксидаз второго типа, лакказ, хитиндеацетилаз, хитинсинтаз, арилсульфатаз и различных ферментов, связанных с окислительно-восстановительными процессами (двойные оксидазы (Duox), пероксидазы, супероксиддисмутазы, каталазы, глутатион-S-трансферазы и др.) (Schoville et al., 2018; Wilhelm et al., 2025).

Согласно атласу экспрессии генов колорадского жука (Wilhelm et al., 2025; <https://cpb-atlas.uni-mainz.de/>), изменение экспрессии генов антигрибной защиты коррелирует с фазами жизненного цикла колорадского жука. Так, на стадии яйца и на I–II личиночных стадиях регистрируется самый низкий уровень экспрессии АМП. Увеличение уровня экспрессии АМП происходит на III–IV личиночных стадиях и далее в фазе куколки и имаго.

1.4.3. Механизмы действия АМП

При рассмотрении различий в механизмах работы антигрибных и антибактериальных пептидов следует отметить, что мишенями для антигрибных пептидов являются не только клеточная мембрана и внутриклеточные компоненты, но и клеточная стенка грибов. Структура клеточной стенки гриба уникальна по сравнению с другими эукариотическими и прокариотическими клетками (Cabib and Arroyo, 2013). Клеточная стенка является первым барьером грибной клетки, который может эффективно противостоять влиянию факторов внешней среды и регулировать осмотическое давление (Zhang et al., 2020). Антибактериальные пептиды разрушают целостность мембран грамотрицательных и грамположительных бактерий по тем же механизмам, что и антигрибные пептиды, но используют для этого другие паттерны для распознавания липосахаридного и фосфолипидного слоёв (Chen et al., 2023; Gong et al., 2023).

Антигрибные пептиды могут являться ингибиторами хитин-синтазы и (1-3)- β -D-глюкан-синтазы, что приводит к нарушению синтеза компонентов клеточной стенки и нормальной морфологии клетки, а также снижает её способность регулировать осмотическое давление (Zhang et al., 2020).

Большинство исследователей выделяют четыре основных механизма действия АМП на любые клеточные мембраны с некоторыми вариациями в их названии (Balandin and Ovchinnikova, 2016; Zhang et al., 2020; Manniello et al., 2021):

1. Модель цилиндрической поры или «бочкообразная» (barrel-stave model);
2. Модель тороидальной поры – червоточины или «тороидальная» (toroidal pore);
3. Модель «ковра» – детергентоподобный мембранолитический механизм или «ковровая модель» (carpet model);
4. Агрегатная модель – неупорядоченная пора или «агрегатная» (aggregate model). Внутриклеточные компоненты, такие как митохондриальная мембрана, белки и нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), также могут быть мишенью для АМП (Zhang et al., 2020).

Рассмотрим вышеперечисленные механизмы подробнее.

1. Модель цилиндрической поры или «бочкообразная» модель (barrel-stave model). Этот механизм впервые предложили Эренштейн и Лекар (Ehrenstein and Lecar, 1977), предположив, что АМП связываются с липидной мембраной и взаимодействуют друг с другом, образуя трансмембранную пору. В этой модели АМП обычно имеют α -спиральную или β -листовую структуру. Амфифильный АМП накапливается на поверхности клеточной мембраны под действием электростатического притяжения, образуя олигомеры. Гидрофобная часть мономерных АМП может встраиваться в фосфолипидный бислой мембраны, выравниваясь перпендикулярно поверхности мембраны, образуя ионный канал бочкообразной структуры. Кроме того, полимерные АМП могут притягивать мономерные АМП для увеличения размера канала. В итоге происходит проникновение в компоненты клеточной мембраны, что приводит к разрушению и гибели клетки (Theis and Stahl, 2004; Soltani et al., 2008; Zhang et al., 2020).

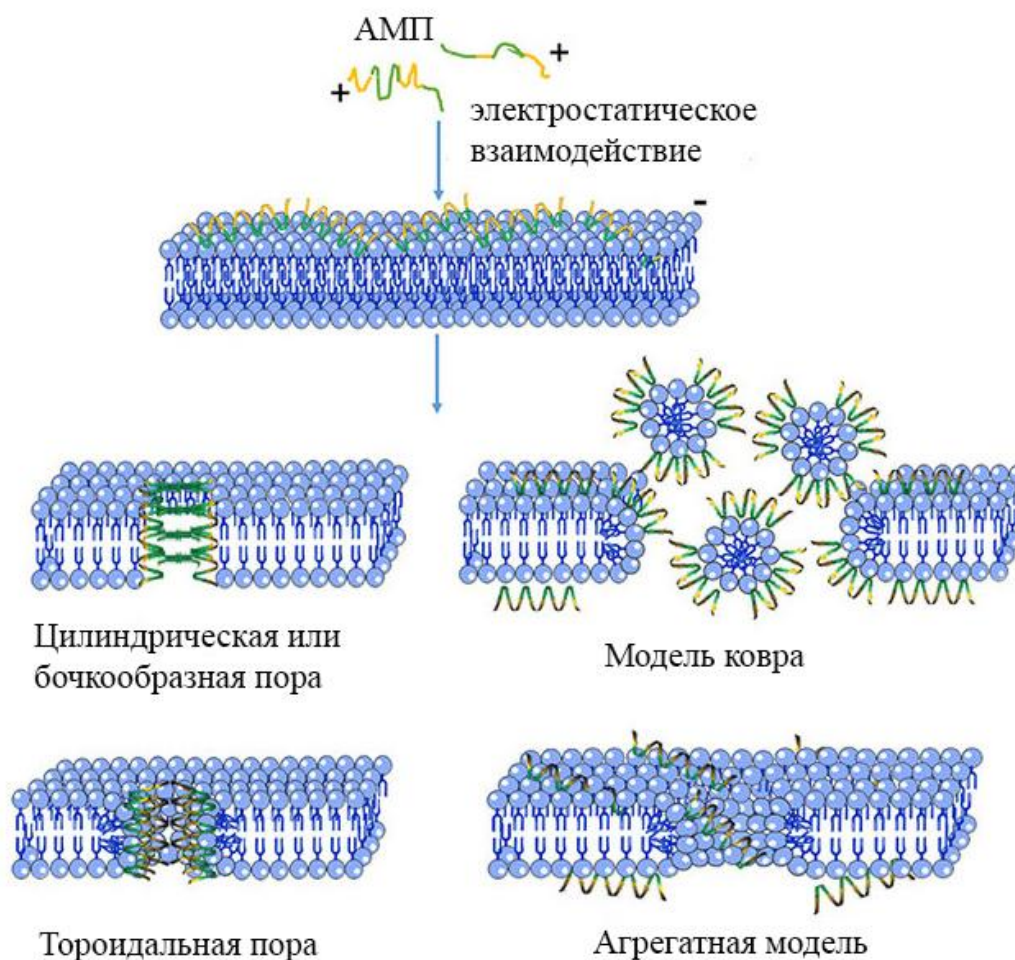


Рис. 2. Предполагаемые механизмы разрушения клеточной мембраны (по Dong et al., 2024).

2. Модель тороидальной поры, червоточкины или «тороидальная» модель (toroidale pore). В тороидальном механизме, в отличие от «бочкообразного», АМП могут внедряться в гидрофобный центр клеточной мембраны (Le et al., 2017; Soltani et al., 2007), в результате чего фосфолипидный бислой изгибается внутрь и образует смешанную полость случайным образом (Yang et al., 2001). Как следствие, мембранные структуры становятся неупорядоченными, что в итоге приводит к гибели клетки (Zhang et al., 2020).

3. Модель ковра или детергентоподобный, мембранолитический механизм, или «ковровая» модель (carpet model). Эта модель может быть адаптирована для β -листных АМП (Moradi et al., 2009; Ahmed and Hammami, 2019). Механизм был

впервые предложен в исследовании с дермасептинами (Pouny et al., 1992), а затем применен к другим типам АМП. В модели «ковра» АМП не встраиваются в фосфолипидный бислой, а связываются с поверхностью мембраны под действием электрических зарядов. В этом случае образуется «ковровый» узор, параллельно покрывающий поверхность мембраны. Гидрофобная сторона «ковра» обращена к клеточной мембране, а гидрофильная – к внеклеточному пространству, что изменяет поверхностное натяжение клеточной мембраны под действием молекулярного натяжения и гидрофобных сил (Lee and Lee, 2015; Guilhelmelli et al., 2013). Когда накопление АМП достигает определенного порога концентрации, они действуют как детергенты, искажая фосфолипидный бислой, что снижает стабильность клеточной мембраны, приводя к ее распаду и лизису клетки (Zhang et al., 2020).

4. Агрегатная модель, неупорядоченная пора или «агрегатная» модель (aggregate model). По механизму «агрегатной» модели (Park and Nahm, 2005), АМП не лизируют клеточную мембрану напрямую, но увеличивают проницаемость клетки (Jenssen et al., 2006). Пептидные молекулы конкурентно замещают Ca^{2+} и Mg^{2+} в липополисахаридах и встраиваются в границы раздела гидрофильных и гидрофобных областей фосфолипидной мембраны (Hancock and Chapple, 1999), что формирует коллоидный комплекс из мембранных структур. По сравнению с моделью «бочкообразной» поры, канал в агрегатной модели является переходным, а пептидные молекулы не имеют определенного направления, что приводит к невозможности верификации амфифильных структур пептидных молекул (Zhang et al., 2020).

1.4.4. Особенности строения клеточной стенки грибов

Основными компонентами клеточной стенки гриба являются гликопротеины, глюканы (β -1,3-глюкан, β -1,6-глюкан, смешанный β -1,3-/ β -1,4-глюкан и α -1,3-глюкан) и хитин (Bowman and Free, 2006). Однако состав и организация клеточной стенки грибов различаются у разных таксонов. Например, у *C. albicans* хитин составляет всего 1–2 %, а у *Aspergillus fumigatus* – от 7 до 15 % (Free, 2013). Хитин,

гомополимер β (1,4)-связанного N-ацетилглюкозамина, синтезируется ферментами хитинсинтазами, разделенными на семь категорий (Lenardon et al., 2010), которые могут быть мишенью для противогрибковых препаратов. Например, нуклеозидные антибиотики полиоксины и никкомицины структурно схожи с нуклеотидным коферментом UDP-N-ацетилглюкозамином, являются эффективными фунгицидами против фитопатогенных грибов (Fiedler et al., 1982). (1,3)- β -D-глюкан может быть мишенью для противогрибковых препаратов: М. Убуката с соавторами (Ubukata et al., 1986) указывают, что неопептины известны как ингибиторы синтеза (1,3)- β -D-глюкана и протеогетерогликанов, а также вызывают набухание мицелия грибов, связанное с подавлением биосинтеза клеточной стенки. Эхинокандины подавляют синтез клеточной стенки грибов путем ингибирования биосинтеза (1,3)- β -D-глюкана за счет неконкурентного ингибирования (1-3)- β -D-глюкан синтазы (Zhang et al., 2020).

1.4.5. Внутриклеточные мишени для АМП в клетках грибов

В дополнение к вышеупомянутым механизмам АМП могут проникать через клеточные мембраны и воздействовать на внутриклеточные мишени, такие как нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), белки и непосредственно мембраны митохондрий. Например, Хасимото с соавторами (Hashimoto et al., 2006) обнаружили, что циклотиазомицин В1 – мощный природный антибиотик из группы циклических тиопептидов, вырабатываемый бактериями рода *Streptomyces*, выступает в качестве ингибитора РНК-полимеразы и вызывает набухание гиф. Хрупкость клеточной стенки, индуцируемая циклотиазомицином В1 посредством его связывания с хитином, была обнаружена Н. Мизухара с соавторами (Mizuhara et al., 2011). Еще одна группа АМП – гистатины, обнаруженные у приматов и обладающие противогрибковой активностью в отношении *C. albicans* (Kavanagh and Dowd, 2004). Связывание гистатинов с рецептором на клеточной мембране гриба приводит к проникновению их в цитоплазму и далее – в митохондрии. Исследования показали, что механизм действия гистатина-5 отличается от механизма образования типичной мембранной

поры (Helmerhorst et al., 1999). Гистатин-5 не имеет сродства к клеточным мембранам и не разрушает плазматическую мембрану. Он пересекает клеточную мембрану через рецепторы или при помощи трансмембранных потенциалов и связывается с митохондриями, вызывая нелигандное высвобождение АТФ в цитоплазму. Связывание высвобожденного АТФ с пуриnergическими рецепторами на поверхности клетки приводит к ингибированию митохондриального дыхания и генерации АКМ, что вызывает апоптоз клеток (Kavanagh and Dowd, 2004; Helmerhorst et al., 2001).

Пример АМП насекомых, проявляющего антигрибную активность через блокирование синтеза компонентов грибной клеточной стенки и подавления сукцинат-коэнзим-Q-редуктазы, – мечниковин из *D. melanogaster*, его механизм действия описан в разделе 1.4.1.

1.5. Лектины, участвующие в иммунном ответе

Большинство растворимых или ассоциированных с мембраной лектинов представляют собой ковалентно или нековалентно связанные олигомерные ансамбли пептидных субъединиц, характеризующихся наличием одного или нескольких углевод-распознающих доменов (англ. CRD) (Taylor and Drickamer, 2003). Современная классификация лектинов животных основана на наличии консервативных мотивов аминокислотной последовательности внутри CRD и таких отличительных свойств, как необходимость наличия двухвалентных катионов или восстановительной среды для связывания лиганда и, что наиболее важно, укладке структуры (табл. 1). В настоящее время признано несколько основных семейств: С-, F-, Р-, R-, X- и I-типы, галектины (ранее S-тип) и гепаринсвязывающие лектины.

Иммуноглобулины, играющие ключевую роль в иммунном ответе позвоночных, генерируют собственное разнообразие путем генетической рекомбинации. Но лектины, как и большинство рецепторов врожденного иммунитета, не обладают такой генетической пластичностью (Pancer and Cooper, 2006). Поэтому один из нерешенных вопросов – как врождённый иммунитет

насекомых справляется с огромным разнообразием потенциальных инфекционных вызовов. Существующая концепция распознавания паттернов патогенов предполагает, что для успешной врождённой иммунной защиты необходимо распознавать лишь несколько молекул на поверхности мембран и клеточных стенок, консервативных для микроорганизмов. Однако высокая вариативность микробных сообществ и динамические изменения в наработке компонентов клеточных стенок и мембран наводят на мысль, что для иммунной защиты может потребоваться значительное разнообразие механизмов распознавания (Vasta et al., 2007; Chen et al., 2025).

Лектины создают разнообразие в распознавании за счёт наличия паралогов, аллельных вариаций или полиморфизмов, альтернативного сплайсинга, тандемных дупликаций генов и образования химерных структур путем перестановки экзонов, а также за счёт структурных основ потенциальной «пластичности» их CRD (Garred et al., 2006; Vasta et al., 2004; Vilches and Parham, 2002). Более подробно будут рассмотрены лектины R-типа, поскольку теоретически они могут играть определенную роль в иммунитете таракановых и жесткокрылых насекомых и, в частности, колорадского жука, но какие-либо данные об их функциях отсутствуют.

1.5.1. Лектины R-типа

Суперсемейство лектинов R-типа характеризуется наличием углевод-распознающего домена, первоначально обнаруженного в полипептиде рицина, растительного токсина. β -лектин токсина рицин был первым обнаруженным лектином с такой структурой и лектины R-типа названы в его честь. В ходе эволюции лектиновый домен R-типа привел к появлению различных форм белков, некоторые из которых содержат только этот домен, а другие - дополнительные функциональные домены (например, ферменты гликозилгидролазы или токсин рицин) (Cummings et al., 2022).

Еще в 1888 году Петер Штильмарк (Peter Hermann Stillmark) сообщил, что экстракты из семян клещевины обыкновенной *Ricinus communis* содержат фактор

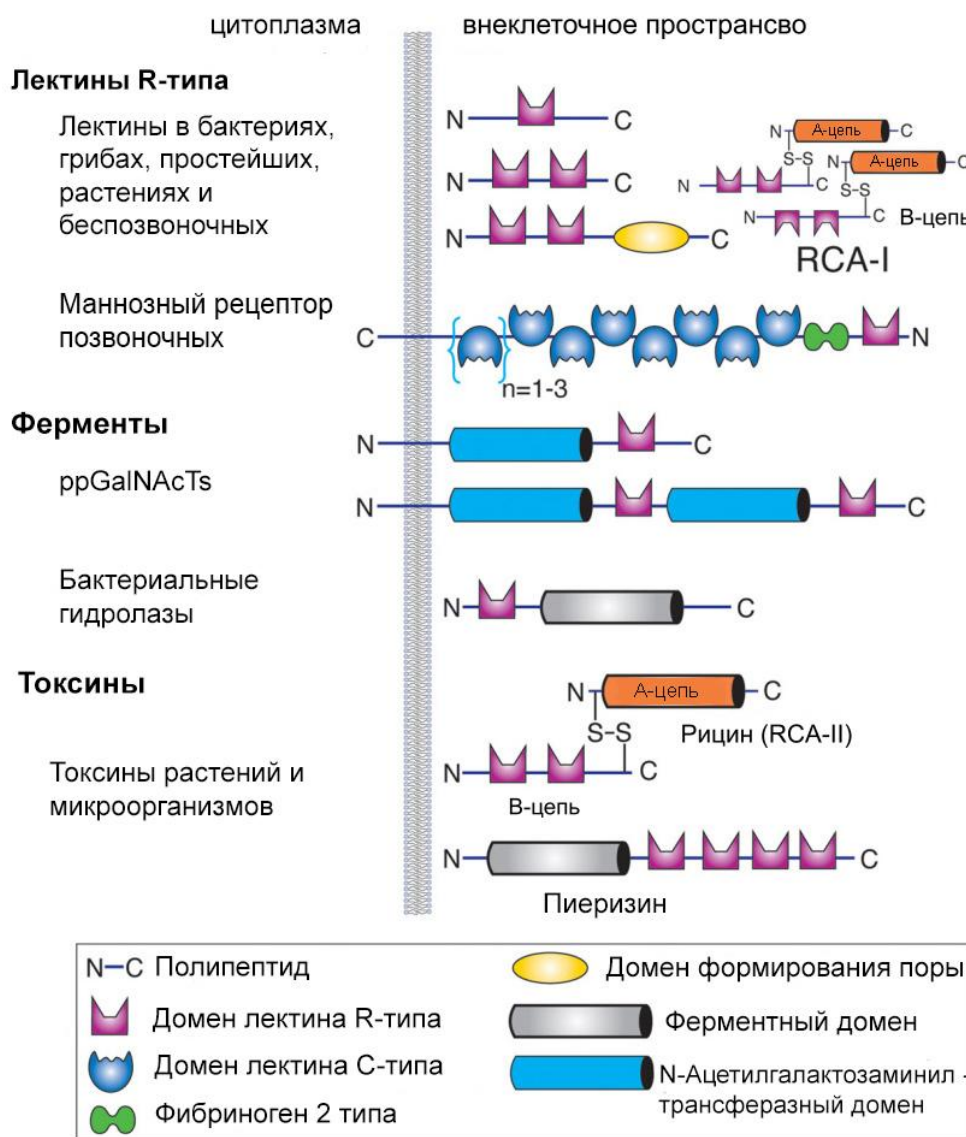


Рис.3. Суперсемейство лектинов R-типа. Различные группы внутри суперсемейства характеризуются доменными структурами, показанными на рисунке (Cummings et al., 2022).

(который он назвал рицином), способный агглютинировать эритроциты (Cummings et al., 2022). Рицин был хорошо известен как токсин, но его углеводно-связывающая специфичность не подвергалась детальному анализу до середины XX века, когда было выяснено, что он состоит из двух субъединиц (пептидных цепей). Субъединица А – несёт рибосомотоксичный RIP домен (ribosome-inactivated protein), субъединица В – была классифицирована как лектин С-типа,

несущая специфический β -трилистниковый домен (Rutenber et al., 1991; Lord et al., 1994).

Структурный анализ рицина показал, что субъединица В имеет форму « β -трефойла» (трехлистника) и несёт углевод-связывающий мотив QxW (глутамин - х обозначает любую аминокислоту - триптофан) в каждом субдоме (петле трехлистника). Более 10% R-лектинов используют эту особенность строения для распознавания гликанов (Hazes, 1996).

Такая доменная структура определяет лектины R-типа, как суперсемейство, которое также классифицируется как семейство углевод-связывающих молекул 13 (<http://www.cazy.org/CBM13.html>) в базе данных Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy). Эти лектины широко представлены во всех трёх биологических доменах (и в их вирусах) в качестве гликан-связывающих белков, включая ферменты и токсины (рис. 3) (Hazes, 1996; Cummings et al., 2022).

В семенах *Ricinus communis* содержится два лектина R-типа, первоначально названных RCA-I и RCA-II. RCA-I является гемагглютинином и очень слабым токсином. RCA-II, более известный как яд рицин, является агглютинином и очень сильным токсином (Cummings et al., 2022).

RCA-II синтезируется в виде одного препрополипептида из 576 аминокислотных (aa) остатков, содержащего сигнальный пептид секреции (остатки 1-35), А-цепь (остатки 36-302), 12-aa линкерную область (остатки 303-314) и В-цепь (остатки 315-576) (Cummings et al., 2022). RCA-II проникает в клетку после связывания В-цепи с поверхностными гликопротеинами клеточных мембран, содержащими галактозу. После того как весь токсин попадает внутрь клетки, цепи диссоциируют. Затем А-цепь связывается со специфическим участком 28S РНК 60S рибосомы, необратимо удаляя аденин (депурирование) из положения, известного как тетрапетля сарцин/рицин (Endo et al., 1991). Это эффективно предотвращает связывание фактора элонгации-2 с рибосомой и останавливает синтез белка, приводя к гибели клетки (Nilsson and Nygård, 1986). Для человека токсичность рицина оценивается в пределах от 5 до 10 мкг/кг при вдыхании частиц размером

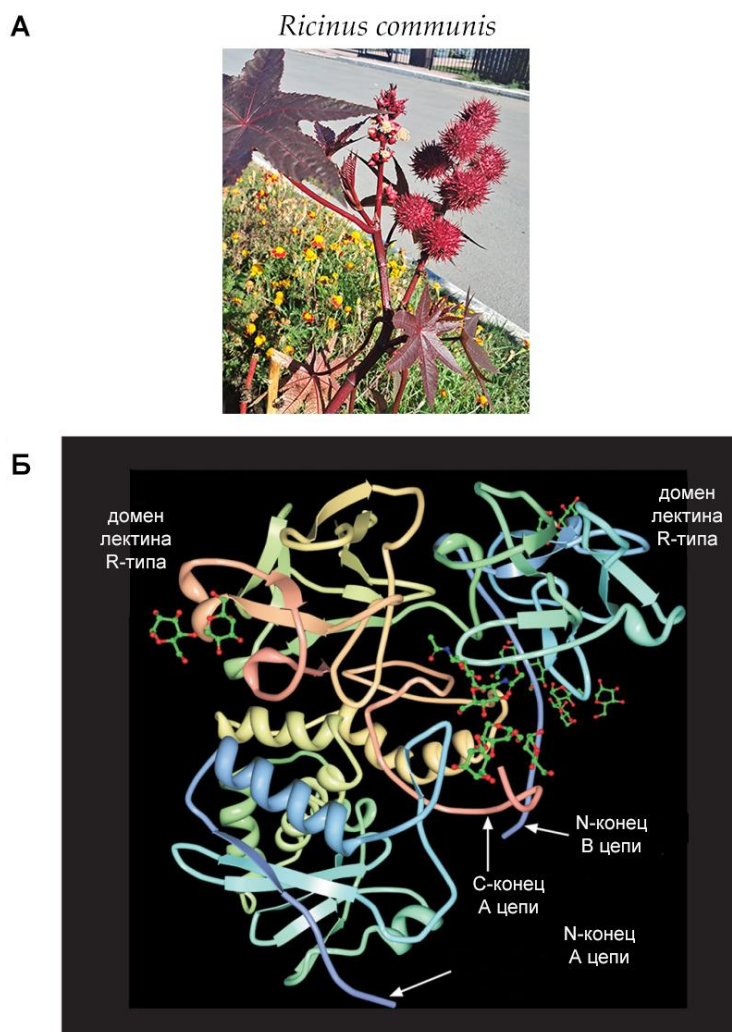


Рис. 4. Структура рицина. (А) Растение *Ricinus communis*. (Б) Кристаллическая структура рицина (RCA-II); разрешение 2,5 Å. (Rutenber E. et al. 1991. Proteins 10: 240–250. Изображение из базы PDB модель 2AAI) (Cummings et al., 2022).

менее 5 мкм и от 1 до 20 мг/кг при приеме внутрь (Audi et al., 2005; Bradberry et al., 2003).

Белки, содержащие в структуре β -трефойл, были разделены на несколько групп на основе биологической функции; к ним относятся лектины, основной фактор роста фибробластов (FGF) (PDB 2AXM), интерлейкин-1 (PDB 1ILT), ингибиторы протеаз типа Кунитца (PDB 4IHZ) и белок сшивания актина гисактофилин (PDB 1HCE), хотя у них нет QxW-мотива (Murzin et al., 1992; DiGabriele et al., 1998; Vigers et al., 1994).

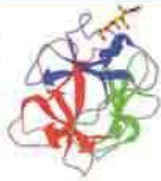
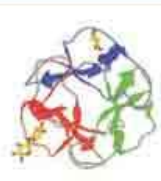
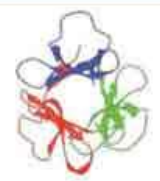
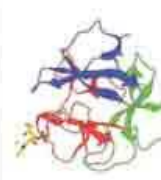
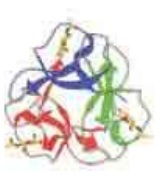
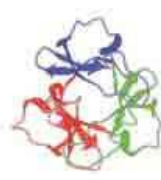
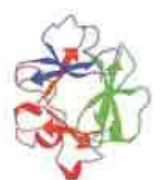
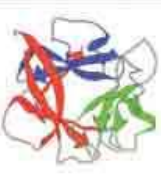
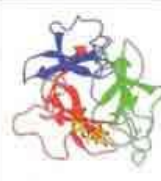
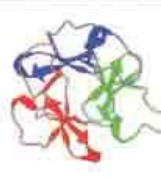
	Лектины R-типа		Ферменты или Токсины		Другие
Бактерии Грибы Слизевики	 АН	 CNL	 HA1	 Хyn10A	 Гисактофилин
Животные	 SeviL	 Cys-MR	 CEL-III	 ppGalNAcT	 FGF
Растения	 EUL	 Амарантин	 Рицин	 SNA	 KTI

Рис. 5. Структуры β -трефойловых складок лектиновых доменов R-типа в различных белках. (Вверху) Структуры, полученные из бактерий, грибов и слизевиков: АН (актинохивин из актинобактерий; PDB 4DEN), CNL (нематоцидный лектин из хвойного гриба *Clitocybe nebularis*; PDB 3NBE), HA1 (нейротоксин бактерии *Clostridium botulinum*; PDB 3AH2), Xyn10A (эндо- β 1-4-ксилаза 10A из бактерии *Streptomyces lividans*; PDB 1ISX) и гисактофилин (актин-связывающий белок гриба слизевика *Dictyostelium discoideum*; PDB 1HCE). (Средняя) Структуры, полученные из животных: SeviL (ганглиозид-связывающий лектин из мидии *Mytilisepta virgata*; PDB 6LF2), Cys-MR (богатый цистеином рецептор маннозы у мыши *Mus musculus*; PDB 1DQO), CEL-III (гемолитический лектин из морского огурца *Cucumaria echinata*; PDB 2Z48), ppGalNAcT (полипептидная α -N-ацетилгалактозаминилтрансфераза пресноводной улитки *Biomphalaria glabrata*; Uniprot S5S833) и FGF (у человека; PDB 2AXM). (Внизу) Структуры, полученные из растений: EUL (лектин из европейского веретеновидного дерева *Euonymus europaeus*; UniProt B3SV73), амарантин (TF-антиген-связывающий лектин из семян амаранта *Amaranthus caudatus*; PDB 1JLX), рицин (домен-1 В-цепи *Ricinus communis*; PDB 2AAI), SNA (Sia α 2-6-связывающий

гликан-связывающий лектин из бузины чёрной (*Sambucus nigra*); UniProt Q41358) и КТИ (ингибитор протеазы типа Кунитца из растения *Crateva tapia*; PDB 4IHZ). Синяя, зеленая и красная полосы, соответственно, обозначают α (N-концевая часть), β и γ (C-концевая часть) субдомены в полипептидах (Cummings et al., 2022).

1.5.2. Лектины R-типа у беспозвоночных

Прототипные R-лектины, содержащие один CRD R-типа, и tandemно-повторные R-лектины, состоящие исключительно из β -трефоильных доменов, были идентифицированы у различных групп беспозвоночных: у представителей губок (*Porifera*), колчатых червей (*Annelida*) (EW29: PDB 2ZQN), моллюсков (*Mollusca*) (UniProt A0A646QVV9) и брахиопод (*Brachiopoda*) (UniProt A0A646QV64) (Cummings et al, 2022). Семейство лектинов мидий (MytiLec: PDB 3WMV; CGL: PDB 5F90) имеет β -трефойловую укладку при отсутствии канонического QxW-мотива. Подобно токсинам Шига, эти лектины связывают три гликана Gb3 (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc) посредством трёх углеводно-связывающих кармана в β -трефойльной складке и тем самым индуцируют сигнальную трансдукцию (Terada et al., 2016; Liao et al., 2016).

В химерных R-лектинах CRD R-типа сочетается с различными функциональными доменами у беспозвоночных. Пиеризин в личинках капустной бабочки (*Pieris brassicae*, L.) содержит N-концевой ADP-рибозилтрансферазный домен и C-концевой лектиновый домен R-типа (Uniprot Q9U8Q4). Этот белок обладает мощной цитотоксической активностью против различных линий раковых клеток человека, индуцируя в них апоптоз (Takamura-Enya et al., 2001; Takahashi-Nakaguchi et al., 2024). α -субъединица фактора свертывания крови G (Uniprot Q27082) в гемолимфе мечехвоста *Carcinoscorpius rotundicauda* (Latreille) содержит два гликозил-гидролазных домена по обе стороны от центрального лектинового домена R-типа (Muta et al., 1995). Другой лектин R-типа, CEL-III (PDB 2Z48) из морского огурца (*Cucumaria echinata* (von Marenzeller)), имеет как порообразующий домен, так и tandemно-повторяющийся домен лектина R-типа и

проявляет гемолитическое действие на эритроциты млекопитающих (Hatakeyama et al., 2007; Uchida et al., 2004).

1.5.3. Лектины R-типа у насекомых отряда Coleoptera

Лектин R-типа обнаруженный у *T. molitor*, имеет два QxW-мотива и β -трефойловую складку. Его экспрессия увеличивалась в ответ на инъекцию иммуногенных стимулов: пептидогликана лизинового типа, пептидогликана DAP-типа, бета-1,3-гликана, а также внутриклеточного патогена *Listeria monocytogenes* (Kim et al., 2013). Для многих других видов насекомых отряда *Coleoptera* (*T. castaneum*, *Asbolus verrucosus* LeConte, *Zophobas morio* (Fabricius)) в ходе геномных и транскриптомных исследований найдены последовательности, охарактеризованные как лектины R-типа, содержащие QxW-мотивы, однако работ по их свойствам и участию в иммунном ответе пока нет.

1.6. Одорант-связывающие белки

Одорант-связывающие белки (eng. OBP – odorant binding protein) – это низкомолекулярные растворимые белки, высокая концентрация которых наблюдается в носовой слизи позвоночных, репродуктивных тканях, а также в лимфе насекомых. Их сродство к запахам и феромонам предполагает их роль в обонятельном восприятии, однако их функции у насекомых не ограничены только распознаванием запахов (Pelosi, 1994). Энтомопатогенный гриб *Metarhizium anisopliae* при заражении саранчи *Locusta migratoria* L. производит летучее соединение - фенилэтиловый спирт, в обнаружении которого участвует OBP11 (LmOBP11). Однако подавление экспрессии гена *OBP11* (*LmOBP11*) неожиданно усиливает иммунный ответ хозяина во время инфекции *M. anisopliae*, что повышает устойчивость насекомых к грибковой инфекции за счет активации экспрессии генов, связанных с Toll-путем, и связанных с ними эффекторов (Zhang et al., 2025). Эти данные устанавливают молекулярную связь, при которой OBP связывает обоняние с каноническим иммунитетом, а затем с поведением, связанным с социальным иммунитетом.

В эксперименте с жуком *Plagioderia versicolora* (Laicharting), после заражения синегнойной палочкой *Pseudomonas aeruginosa* наблюдалось увеличение экспрессии гена *OBP18* (*PverOBP18*) в 1.8 раз. А нокдаун гена *PverOBP18* методом РНК-интерференции значительно снизил экспрессию гена рецептора бактериального распознавания PGRP (*PGRP*) и гена АМП аттацина (*PverAttacin*), а также снизило устойчивость *P. versicolora* к инфекции *P. aeruginosa* (Rong et al., 2024). Это является примером положительной связи между OBP и экспрессией генов иммунного ответа.

1.7. Белки теплового шока

Белки теплового шока (eng. HSP – heat shock protein) относятся к фолдинговым белкам. Они помогают клеткам и организмам пережить различные стрессы. Изначально HSP были открыты у плодовых мушек как ответная реакция на тепловой стресс (Ritossa, 1962), но сейчас известно, что их экспрессия также повышается в ответ на другие виды стресса, например, на холод (Matz et al., 1995), ультрафиолет (Cao et al, 1999), во время заживления ран и перестройки тканей (Laplane et al., 1998). Фолдинговые белки помогают другим белкам сформировать биологически активную и самую энергетически выгодную четвертичную структуру из первичной (Alberts et al., 2002). АТФ-независимые малые HSP (12–43 кДа) и АТФ-зависимые семейства, такие как HSP60, HSP70 и HSP90, выполняют специализированные роли, облегчая сворачивание растущих полипептидов, предотвращая агрегацию денатурированных белков во время стресса и помогая клеточному восстановлению после воздействия (Tutar and Tutar, 2010).

Белки теплового шока критически важны для устойчивости насекомых, защиты клеточной целостности и регуляции иммунного ответа на биотические, абиотические и антропогенные (пестициды и фрагментация среды обитания) стрессы (Banfi et al., 2025). HSP играют решающую роль в иммунных реакциях, интегрируясь в иммуносигнальные пути иммунитета насекомых. Такие белки теплового шока, как HSP70 и HSP90, могут модулировать активность иммунных путей, стабилизируя ключевые сигнальные белки, усиливая активацию факторов

транскрипции или способствуя быстрому обмену компонентов иммунной системы. Эти взаимодействия предполагают, что HSP способствуют не только стрессоустойчивости, но и иммунной устойчивости, что подчёркивает их двойную защитную роль в условиях воздействия окружающей среды и биологических факторов (Li et al., 2012; Banfi et al., 2025).

В ряде работ, выполненных в лабораториях патологии насекомых и экологической паразитологии ИСиЭЖ СО РАН, показано увеличение экспрессии генов *hsp70* и *hsp90* при линьке личинок и при грибной инфекции (Kryukov et al., 2021; Kryukov et al., 2022; Rotskaya et al., 2021).

1.8. Белки антиоксидантной защиты

К ферментам антиоксидантной защиты насекомых относятся пероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы, глутатион-S-трансферазы и ряд других белков. В нашей работе в качестве маркера антиоксидантной системы взят ген, кодирующий каталазу. Данный фермент наряду с супероксиддисмутазой и пероксидазой, контролирует динамику общего пула АКМ и РФА в тканях организма. Фермент регулирует количество перекиси водорода, разлагая её на воду и кислород. Каталазы локализованы преимущественно в клеточных пероксисомах, обнаруживаются и в цитоплазме, и в митохондриальном матриксе (Zhang and Feng, 2018).

В третьей аннотированной версии генома колорадского жука, принятой с 5 июня 2025 года, фермент каталаза представлен четырьмя паралогами (гены LOC111503833, LOC111516285, LOC111511045, LOC111516683). В нашей работе индекс «56» присвоен ферменту, который кодируется геном LOC111516285, как две последние цифры в идентификационном номере мРНК фермента по аннотации Ldec 2.0 (XM_023172456.1), в актуальной на данный момент аннотации Ldec 3.0 номер мРНК этого фермента – XM_074179482.1. Из всех паралогов каталаз *L. decemlineata* для кПЦР был выбран именно этот т.к. он показывал наибольшее снижение экспрессии гена после заражения грибами в данных RNAseq (Kryukov et al., 2026; см также Приложение. Таблица 3).

1.9. Регуляция экспрессии генов АМП на примере жуков *Tenebrionidae* и *D. melanogaster*

С точки зрения функционирования иммуносигнальных каскадов самым исследованным насекомым на сегодняшний день остаётся *D. melanogaster*. Схемы работы иммуносигнальных путей дрозофилы находят подтверждение у других организмов, в том числе у представителей отряда Coleoptera, среди которых наиболее изученными модельными видами являются большой мучной хрущак *T. molitor* и малый мучной хрущак *T. castaneum* (Coleoptera; Tenebrionidae).

Как и у других насекомых, IMD путь у *T. molitor* инициируется путем обнаружения инфекционных агентов через паттерн распознающие рецепторы содержащие различные PGRP, такие как PGRP-LC или PGRP-LE (Keshavarz et al., 2020a). На финальных этапах внутриклеточного сигнального каскада транскрипционный фактор Relish активирует экспрессию ряда генов АМП (Keshavarz et al., 2020b). У *T. molitor* были идентифицированы и функционально охарактеризованы основные компоненты IMD-пути, такие как PGRP-LE, белок IMD, FADD, Dredd, TAK1, IKK-gamma, IKK-epsilon, Relish и девять генов АМП (Tenecin1, Tenecin4, Attacin1a, Attacin1b, Attacin2, ColeoptericinA, ColeoptericinC, Defensin и Defensin-like) (Keshavarz et al., 2020a; Jang et al., 2022).

Исследования Като с соавторами (2023) показали, что 18 генов АМП *T. castaneum* были разделены на четыре группы в соответствии с профилями их индукции микроорганизмами (Kato et al., 2023). Кроме того, вопрос о том, регулируются ли четыре типа АМП путем IMD или Toll или обоими путями, определяли с использованием куколок с нокдауном генов *IMD-protein* или *MyD88* (репрезентативные гены путей IMD и Toll соответственно). Результаты показали, что АМП были разделены на 1) зависимые от IMD-пути, 2) от Toll-пути, 3) от обоих путей, 4) независимые ни от IMD, ни от Toll-пути. Например, цекропины (Cec2 и Cec3) представляют собой Toll-зависимые АМП с медленной и устойчивой индукцией, которая была умеренной или слабой по сравнению с IMD-

зависимыми или Toll и IMD АМП (Yokoi et al., 2012a; Yokoi et al., 2012b). Кроме того, чтобы выяснить механизм путей Toll и IMD у *T. castaneum*, Като с соавторами (2023) определили, участвуют ли ортологи генов путей Toll и IMD в Toll- или IMD-зависимой передаче сигналов. Результаты показали, что каноническая передача сигнала через внутриклеточные компоненты путей Toll и IMD была консервативной и оба пути активировались как грамотрицательными, так и грамположительными бактериями и дрожжами. Поскольку PGRP-LA в основном участвовал в индукции АМП обоими группами бактерий, то это было наиболее характерным отличием от системы продукции АМП у *D. melanogaster* (Yokoi et al., 2022a; Yokoi et al., 2022b; Koyama et al., 2015). Активация экспрессии генов АМП *T. castaneum* в зависимости от транскрипционного фактора IMD или Toll путей (транскрипционные факторы IMD-Rel и Toll-Dif) и мотивы их связывания с регуляторными участками генов АМП приведены в таблице 1.

Таблица 1. Потенциальные мотивы связывания NFκB (IMD-Rel и Toll-Dif), обнаруженные в регуляторных областях генов АМП *T. castaneum* (Yokoi et al., 2012b).

Группа	АМП	Цепь ДНК	Мотив посадки домена <u>каппаВ</u>	Позиция (a)	Транскрипционный фактор
I	<i>Att1</i>	(-)	GGGACTTTAC	-78 ... -69	IMD-Rel
	<i>Att2</i>	(+)	GGGAATCACA	-87 ... -78	IMD-Rel
	<i>Coleoptericin1</i>	(+)	GGGACTTTCC	-116 ... -107	IMD-Rel
	<i>Coleoptericin2</i>	(+)	GGGACTTCCC	-105 ... -96	IMD-Rel
	<i>Def2</i>	(-)	TGGATTTTCC	-102 ... -93	IMD-Rel
II	<i>Def3</i>	(+)	GGGACTTTAC	-79 ... -70	IMD-Rel
		(-)	GGGACTTCAC	-106 ... -97	IMD-Rel
		(+)	TTGGTTTTTT	-2077 ... -2068	Toll-Dif
III	<i>Cec2</i>	(+)	TTGGTTTTCC	-120 ... -111	Toll-Dif
	<i>Cec3</i>	(+)	TTGGTTTTCC	-100 ... -91	Toll-Dif

(a) так как сайт инициации транскрипции для этих генов не определён, то позиция указана относительно старт-кодона ATG

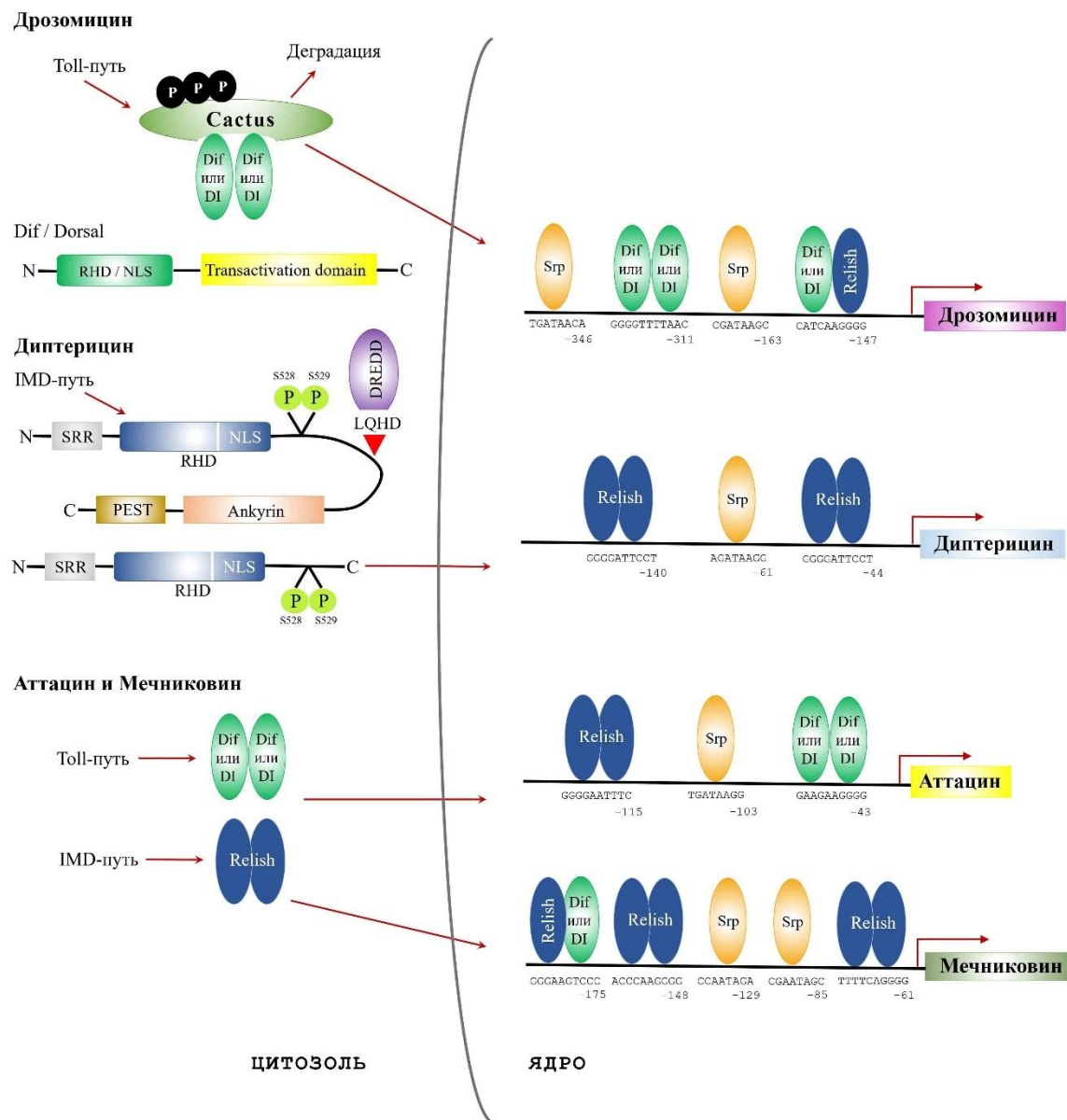


Рис. 6. Схема индукции экспрессии генов АМП для *D. melanogaster* (адаптировано из Ganesan et al., 2011).

Согласно базе данных KEGG у *D. melanogaster* есть несколько транскрипционных факторов NFκB со специфическими κB-сайтами Dorsal/Dif (Dmel_CG6667, Dmel_CG6794) и Relish (Dmel_CG11992) (<https://www.kegg.jp/pathway/map=dme04624&keyword=toll>). Транскрипционные факторы NFκB, активируясь по путям Toll и IMD, транслоцируются в ядро и

связываются со специфическими κВ-сайтами в регуляторной области генов АМП. Dif и Dorsal (Dl) активируются сигналом Toll через деградацию белка-ингибитора IκB Cactus. Активация Relish запускается сигналом IMD через DREDD-зависимое эндопротеолитическое расщепление для удаления С-концевого IκB-подобного домена и IKK-опосредованное фосфорилирование серинов 528 и 529. На рисунке 6 представлены выбранные гены АМП дрозомидина, диптерицина, аттацина А и мечниковина с их проксимальными транскрипционными факторами Dif, Dorsal или Relish связывающими κВ-сайты и транскрипционным фактором Серпент (Serpent (Srp)) связывающим GATA-сайты (Tanji et al., 2007). Экспрессия гена *attacinA* требует, как Dif, так и Relish транскрипционных факторов и, следовательно, содержит отдельные сайты связывания для каждого из них, в то время как диптерицин требует только Relish и имеет два Relish-специфичных сайта. Дрозомидин и мечниковин содержат отдельный сайт для Dif/Relish, который реагирует и на Dif, и на Relish. Неясно, связывает ли этот сайт гетеродимер (как предполагается на этом рисунке) или он функционирует, связывая один из гомодимеров. Кроме того, энхансер мечниковина содержит отдельные Relish-специфичные сайты, в то время как дрозомидин имеет только один Dif/Dorsal-специфичный сайт.

Вышеописанные характеристики сайтов регуляции транскрипции АМП говорят о сложности однозначного выбора транскрипционных факторов, РНК-интерференция которых может привести к выраженному снижению экспрессии целевых АМП.

1.10. Исследования и картирование генома и транскриптома колорадского жука

Полный геном колорадского жука был секвенирован и доступен исследователям на ресурсах NCBI GenBank и Ensembl. Его размер около 1,008 Мб (тысяч пар оснований), 29 606 белок-кодирующих генах на 18 хромосомах. Первое полногеномное секвенирование было осуществлено в 2018 году командой учёных их Университета Висконсин-Мэдисон (24 671 транскриптов генов),

данные были выложены в базу NCBI GenBank и была осуществлена первая аннотация генома (Schoville et al., 2018).

В 2023 году, благодаря сочетанию технологий скаффолдинга PacBio HiFi и Hi-C, было достигнуто более качественное прочтение и произведена качественная сборка на уровне хромосом, что позволило получить более полный и стабильный геном с 18 хромосомами и 29 606 генов, кодирующих белки (Yan et al., 2023). В 2025 году на основе анализа данных был создан атлас экспрессии генов, предлагающий полный набор данных об экспрессии генов на разных стадиях развития и в разных тканях. Этот ресурс был создан с использованием технологий секвенирования с коротким и длинным прочтением для улучшения предыдущих аннотаций и идентификации тысяч новых генов (Wilhelm et al., 2025).

Первое секвенирование, сборка de novo и аннотация транскриптома для колорадского жука была проведена в 2014 году. Команда европейских учёных исследовали личинок и имаго колорадского жука европейской популяции для выявления генов специфичных для диапаузы и участвующих в устойчивости к *Bacillus thuringiensis* (Kumar et al., 2014).

В 2016-2018 годах были опубликованы несколько исследований транскриптома колорадского жука направленных на выявление генов, участвующих в устойчивости к имидоклоприду (Clements et al., 2016; Clements et al., 2017; Clements et al., 2018; Gaddelapati et al., 2018).

В 2019 году канадские учёные опубликовали исследование изменений транскриптома и протеома колорадского жука при низких температурах. Было выявлено 2840 белков, участвующих в ответ на холод, принимающих участие в отдельных метаболических каскадах и в процессах, связанных с РНК (Govaere et al., 2019).

1.11. РНК-интерференция

РНК-интерференция это процесс при котором двухцепочечная РНК (дцРНК) подавляет экспрессию генов на этапах транскрипции или трансляции за счёт

взаимодействия комплементарных последовательностей с целевыми матричными РНК (мРНК) (Hannon, 2002; Fire et al., 1998).

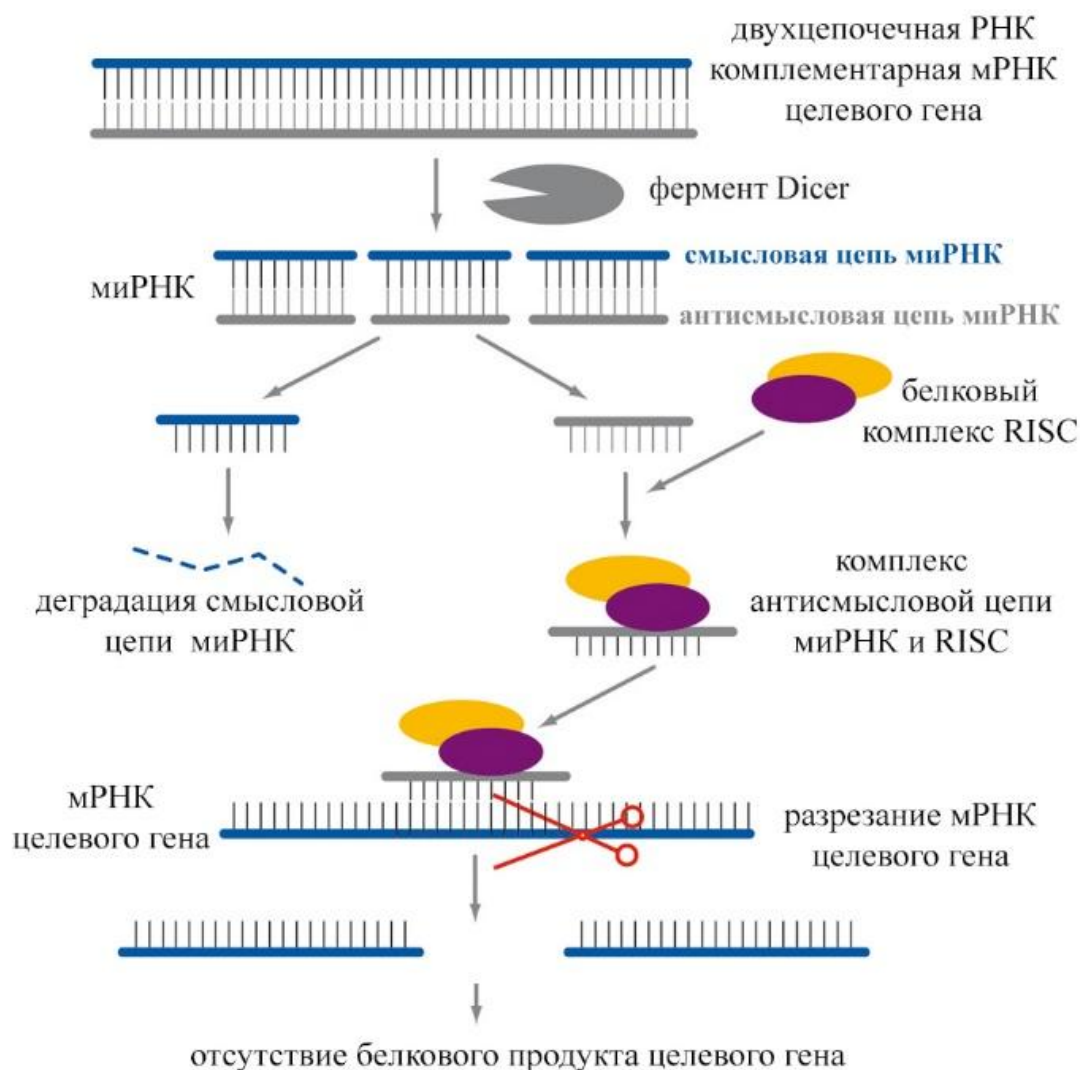


Рис. 7. Схема РНК-интерференции. RISC – РНК-индуцированный комплекс сайленсинга. Dicer – эндорибонуклеаза. миРНК – малые интерферирующие РНК. (сайт rusnano.com с авторской доработкой)

Путь РНК-интерференции является естественным процессом, обнаруженным у многих эукариот. Он инициируется ферментом эндорибонуклеазой Dicer, который расщепляет длинные молекулы дцРНК на короткие двухцепочечные фрагменты, приблизительно 21-23 нуклеотидов длиной – малые интерферирующие РНК (миРНК (siRNA)). Каждая миРНК раскручивается на две одноцепочечные РНК, пассажирскую (смысловую) цепь и

направляющую (антисмысловую) цепь. Затем пассажирская цепь расщепляется (деградирует) белком Argonaute 2 (Ago2), а направляющая (антисмысловая) цепь включается в комплекс РНК-индуцированного сайленсинга (RISC). Затем сборка RISC связывает и разрушает целевую мРНК. В частности, это достигается, когда направляющая цепь спаривается с комплементарной последовательностью в молекуле целевой мРНК и вызывает расщепление Ago2, каталитическим компонентом RISC. У некоторых организмов этот процесс распространяется системно, несмотря на изначально ограниченные молярные концентрации siRNA (Agrawal et al., 2003; Matranga et al., 2005).

Эффективность РНК-интерференции сильно различается между видами. У растений и многих нематод подавление экспрессии генов с помощью РНК-интерференции легко достигается благодаря наличию синтеза вторичных siRNA, опосредованных РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRp) (Mourrain et al., 2000; Sijen et al., 2001). Подобная RdRp никогда не была обнаружена у насекомых, но, основываясь на высокой чувствительности к РНК-интерференции у некоторых видов насекомых, например, у нескольких видов жесткокрылых, можно задаться вопросом, может ли у этих насекомых присутствовать альтернативная система усиления сигнала подавления, позволяющая им компенсировать отсутствие RdRp (Guan et al., 2018). При этом эффективность РНК-интерференции относительно низка у чешуекрылых насекомых по сравнению с другими отрядами (Terenius et al., 2011). Деградация дцРНК, а также клеточное поглощение и транспорт, по-видимому, являются основными причинами различной эффективности РНК-интерференции среди насекомых. Ряд исследований показали, что дцРНК может оставаться стабильной гораздо дольше у многих жесткокрылых по сравнению с большинством чешуекрылых (Shukla et al., 2016; Garbutt et al., 2013; Prentice et al., 2017; Bucher et al., 2002; Willow et al., 2021). Также показано успешное применение РНК-интерференции на основе дцРНК на колорадском жуке, в том числе были разработаны коммерческие инсектициды, содержащие целевые дцРНК.

1.11.1. РНК-интерференция у колорадского жука

Известен широкий спектр работ с целевыми дцРНК на гены колорадского жука. Например, Жу с соавторами (Zhu et al., 2011) оценили эффективность РНК-интерференции в популяции колорадского жука. Экспрессия пяти целевых генов (*βact*, *sec23*, *vATPaseE*, *vATPaseB* и *COPβ*) была успешно подавлена, что привело к увеличению смертности личинок и замедлению роста насекомых. В работе Хулиан-Чавес с соавторами (Julian-Chávez et al., 2024) разработали и синтезировали *in vitro* дцРНК различной длины, нацеленные на ген *ACE1*, который кодирует изоформу ацетилхолинэстеразы (AChE1) у колорадского жука. дцРНК длиной 670 п.н. вызывала самый высокий уровень смертности: 63% выживших личинок к девятому дню.

На основе РНК-интерференции разработаны методы для регуляции численности колорадского жука. Все они делятся на 2 класса: трансгенные (когда дцРНК синтезируется в генно-модифицированном картофеле) и нетрансгенные (когда препараты с дцРНК распыляются на листья картофеля).

Ляо с соавторами (Liao et al., 2023) изучали модель генно-модифицированного картофеля, в пластидах которой нарабатывается дцРНК, нацеленная на ген бетта-актина (*βact*) колорадского жука. Высокая экспрессия *dsAct*, управляемая промотором *rrn16* (*Prrn*), в хлоропластах листьев растений обеспечивает высокую устойчивость к колорадскому жуку. В США применяется распыляемый нетрансгенный инсектицид Ледпрона (Ledprona), активный ингредиент которого (дцРНК) воздействует на синтез β-субъединицы протеасомы типа 5 (*dsPSMB5*). (Rodrigues et al., 2021; Pallis et al., 2022). Воздействие низких концентраций ледпрона на личинок четвертой стадии нарушало их окукливание. Воздействие на имаго значительно снижало их подвижность через семь дней, а также их плодовитость (Pallis et al., 2023).

При всех успехах в указанных подходах борьбы с колорадским жуком сообщается о выработке устойчивости к инсектицидам на основе дцРНК. Так Мишра с соавторами (Mishra et al., 2021) сообщают о формировании в популяции колорадского жука (линия CEAS 300) более чем 11.100-кратной устойчивости к

дцРНК, направленной на ген субъединицы А V-АТФазы, после девяти этапов селекции с использованием нетрансгенной доставки - путем нанесения инсектицида на листья. Устойчивость была связана с отсутствием подавления экспрессии целевого гена у личинок линии CEAS 300 и перекрестной устойчивостью к другой целевой двухцепочечной РНК (*COP1β*). Также устойчивость к дцРНК у этой линии передается как аутосомно-рецессивный признак. Эти данные представляют собой первый задокументированный случай устойчивости у насекомого-вредителя к пестицидам с использованием дцРНК, при использовании нетрансгенных методов доставки инсектицида (Mishra et al., 2021).

1.12. Заключение обзора литературы

Таким образом, исследования инфекционных патологий колорадского жука были сосредоточены преимущественно на двух аспектах: 1. влияние инфекций *Bacillus thuringiensis* на клеточный и гуморальный иммунитет и насекомого (García-Robles et al., 2020; Polenogova et al., 2021) 2. исследование инфекций, вызываемых *Beauveria* и *Metarhizium* совместно с воздействием различных природных токсикантов на клеточный иммунитет и активность антиоксидантных и детоксицирующих ферментов насекомого (Abdukerim et al., 2025; Konopická et al., 2024; Tomilova et al., 2016; Yaroslavtseva et al., 2017; Kryukov et al., 2018). Однако практически отсутствуют работы посвященные регуляции иммуносигнальных путей колорадского жука при инфекционных патологиях. При этом проведены глубокие исследования посвящённые аннотации генома и транскриптомов, а также и РНК-интерференции отдельных генов колорадского жука (Clements et al., 2017; Gaddelapati et al., 2018; Petek et al., 2020; Wu et al., 2019; Liu et al., 2022). В ходе этих работ были аннотированы гены - участники гуморального иммунного ответа колорадского жука: рецепторы, белки передачи сигнала, транскрипционные факторы, эффекторы (АМР), что позволяет выбрать гены-кандидаты для изучения иммунного ответа на различные инфекции. Гены, кодирующие антигрибные пептиды колорадского жука (тенецин-3, холотрицин-3,

тауматин и др.) установлены по их паралограм у других представителей Coleoptera и их антигрибное действие подтверждено в *in vitro* и *in vivo* тестах (Hussain et al., 2016; Maistrou et al., 2018). Однако изменение экспрессии генов иммунного ответа при грибных инфекциях на разных стадиях патогенеза и в разных тканях не изучено.

Кроме того, для насекомых в целом не изучено участие рицин-подобных β -лектинов (R-лектинов) в иммунном ответе. Для того, чтобы понять – действительно ли R-лектины могут выступать эффекторами в иммунном ответе, экспрессия их генов соотносится с экспрессией генов АМП. Таким образом АМП колорадского жука и другие эффекторы иммунного ответа (HSP, OBP) выступают в этой работе как референсные эффекторы.

Вопрос участия R-лектинов в иммунном ответе является особенно перспективным, так как целевое снижение экспрессии антигрибных эффекторов (АМП и лектинов) может увеличить эффективность воздействия биопрепаратов на основе энтомопатогенных грибов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Грибы и насекомые

В работе использовали штаммы *B. bassiana* (Sar-31), *M. robertsii* (P-72 или MB-1) и *Cordyceps fumosorosea* (Pad-39) из коллекции микроорганизмов Института систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук. Грибы культивировали на среде 1/4 Сабура (1/4SDAY) либо на дважды автоклавированном просе (Kryukov et al., 2017) в течение 10–17 суток (в зависимости от штамма) до активного конидиообразования. Затем конидии собирали с помощью шпателя либо почвенного сита, сушили при комнатной температуре 10 суток и хранили при 4 °С. Конидии суспендировали в водном растворе Твина-20 (0,03%) и определяли их концентрацию с помощью стандартных гемоцитометров. Жизнеспособность конидий оценивали по доле проросших конидий после посева на среду 1/4SDAY. Для инфицирования использованы культуры с проращением конидий > 95%.

Личинки III возраста колорадского жука были собраны с частных полей вблизи г. Карасук (Россия, Новосибирская область, 53°43'05.4" N 77°38'14.4" E). Личинок содержали при температуре 25 °С и фотопериоде 16:8 ч (свет:темнота) на побегах *Solanum tuberosum* в 20-литровых вентилируемых баках. При достижении IV возраста личинок отбирали в эксперименты. Работа осуществлялась на базе Карасукского научного стационара ИСиЭЖ СО РАН.

2.2. Инфицирование разными видами энтомопатогенных грибов и экспрессия генов иммунного ответа в тканях жирового тела, кутикулы и гемоцитов на разных этапах инфекции

2.2.1. Схема эксперимента

Для инфицирования использовали личинок, недавно перелинявших в IV возраст (2–4 ч после линьки). Насекомых заражали путем погружения в водно-твинную (0,03% Твин-20) суспензию конидий гриба на 15 с: *B. bassiana* (Sar-31), *M. robertsii* (MB-1) и *C. fumosorosea* (Pad-39) (2×10^6 конидий/мл). В контроле

насекомых обрабатывали 0,03%-м водным раствором Твина-20. Личинок помещали в 300-миллилитровые вентилируемые пластиковые контейнеры (10 особей на контейнер) и ежедневно кормили листьями картофеля, помещёнными черешками в пробирки типа Эппендорф, тампонируемые влажной ватой. Смертность определяли в 4–5 повторностях (1 повторность = 10 личинок) и регистрировали ежедневно в течение 10–12 суток. Через 24 и 72 часа был проведён отбор тканей жирового тела, кутикулы и гемоцитов. Для каждого варианта эксперимента использовано 6 биологических повторностей (1 повторность = 6 личинок для жирового тела и кутикулы; 1 повторность = 10 личинок для гемоцитов).

2.2.2 Отбор образцов тканей

Личинок умерщвляли путем декапитации. Для сбора гемоцитов от одной личинки забирали до 20 мкл гемолимфы путем прокола дорсальной части 3-го грудного сегмента и последующего сбора с помощью автоматической пипетки. Образцы пулировали в 200 мкл охлаждённого антикоагулянтного буфера (62 mM хлорид натрия, 100 mM глюкоза, 100 mM ЭДТА, 30 mM лимоннокислый натрий, 26 mM лимонная кислота, pH=4,5) и центрифугировали при 4 °C 5 мин 500 g, с последующим удалением супернатанта. Затем осадок ресуспендировали в 100 мкл HEPES и центрифугировали 5 мин при 500 g и 4 °C с последующим удалением супернатанта. Далее осадок ресуспендировали в 20 мкл физраствора, переносили в сухую криопробирку и замораживали в жидком азоте.

Кутикулу очищали шпателем от жирового тела в холодном фосфатном буфере, pH = 7,4 в чистой чашке Петри без воска. Головную капсулу и ноги удаляли. Ткань помещали в сухую криопробирку. Жировое тело, отделенное от кутикулы, очищали от кишечника и мальпигиевых сосудов с помощью пинцетов и шпателей также в холодном фосфатном буфере и помещали в сухие криопробирки. Затем ткани замораживали в жидком азоте.

2.2.3 Выделение суммарной РНК

Выделение суммарной РНК из образцов проводили по методу Хомчинского и Сакки, адаптированной для реагента Лира (BioLabMix, Новосибирск). Ткани образцов лиофилизировали при 400 мТорр в течение 24 ч. Ткань кутикулы разрушали при помощи пластикового пестика в жидком азоте в 1,5 мл пластиковой пробирке. Для тканей жирового тела и гемоцитов разрушение не требовалось. Далее ко всем тканям добавляли по 1 мл реагента Лира и гомогенизировали пипетированием. После 10 мин инкубирования при комнатной температуре образцы центрифугировали 10 мин при 12 000 g и 4 °С. Весь супернатант образца переносили в новую охлаждённую пробирку с 200 мкл хлороформа, немедленно вортиксовали до образования суспензии. Затем образцы инкубировали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали как указано выше. Верхнюю прозрачную фракцию отбирали в новую охлаждённую пробирку и добавляли равный объём охлаждённого изопропилового спирта. Преципитацию проводили в течение ночи при -20 °С. Далее образцы центрифугировали 30 мин при 16 000 g и 4 °С, супернатант удаляли, а осадок, не ресуспендируя, дважды отмывали 85% этанолом, добавляя первый раз 500 мкл, а второй раз 150 мкл и центрифугировали при 16 000 g при 4 °С 5 мин. Затем этанол максимально удаляли и осадки сушили при комнатной температуре 7 мин. Осадки растворяли в 20 мкл (для образцов из ткани кутикулы и гемоцитов) или 40 мкл (для образцов из ткани жирового тела) стерильной воды, обработанной ДЕПК. Концентрацию и чистоту выделенной суммарной РНК определяли спектрофотометрически на приборе NanoVue Plus (GE Healthcare).

2.2.4 ДНКазная обработка суммарной РНК

Для очистки суммарной РНК от примесей ДНК все образцы доводили до концентрации РНК $\approx 1,5$ мкг/мкл. 4 мкл образца добавляли к 10-кратному буферу и ферменту ДНКазы I в пропорциях согласно инструкции к ферменту DNase I (RNase-free) (TransGen Biotech, Beijing, China). Смесь в тонкостенных пробирках

(0,5 мл) помещали в БИС-амплификатор на 45 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением стоп-раствора (50 мМ ЭДТА) в пропорции 1:10 к общему объёму реакции с последующим нагреванием реакционной смеси до 72 °С в течение 10 мин.

2.2.5 Синтез кДНК

Перевод в кДНК осуществляли набором cDNA RevertAid (Thermo Fisher Scientific, Lithuania) согласно инструкции производителя с небольшими модификациями. В тонкостенных пробирках на 0,5 мл смешивали 8 мкл РНК в смеси из реакции ДНКазной обработки с 2 мкл праймера 9N 100 мкМ и 3 мкл стерильной воды, обработанной ДЕПК. Смесь нагревали до 65 °С на 5 мин и после помещали пробирки на лёд. Далее добавляли 7 мкл смеси, содержащей реакционный буфер RevertAid, dNTP и рекомбинантную ревертазу M-MuLV RevertAid, смешанных согласно инструкции. Реакцию обратной транскрипции проводили в амплификаторе БИС по программе: 37 °С – 60 мин, 42 °С – 30 мин, 50 °С – 10 мин, 75 °С – 5 мин. Образцы полученной кДНК хранились при -20 °С.

2.2.6 Количественная ПЦР (кПЦР)

кПЦР проводили в объёме 15мкл с использованием смеси БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2x) (BioLabMix, Новосибирск, Россия), содержащей все необходимые для реакции компоненты, кроме праймеров и кДНК. Образцы кДНК перед добавлением в реакцию разбавляли в 50 раз и смешивали их с ген-специфичными праймерами для целевых и референсных генов. Праймеры были подобраны для оптимальной работы при единой температуре отжига – 62 °С. Амплификацию проводили на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad, Геркулес, США) по программе 95 °С – 3 мин; 40 циклов: 94 °С – 15 с, 62 °С – 30 с со считыванием флуоресценции; кривые плавления в диапазоне 70–90 °С с шагом 0,5 °С по 5 с со считыванием флуоресценции. Построение кривых плавления пцр-продукта после каждой реакции проводилось как контроль корректного прохождения реакции амплификации. Каждый образец исследовался в трёх аналитических повторностях.

Обработка данных и расчёт экспрессии генов интереса выполнялись по методике $\Delta\Delta C_q$ при помощи программы Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, Геркулес, США). Исследованы целевые гены рецепторов *PGRP-LF*, *PGRP-SC*, компонентов Toll пути – *Toll1_rec*, *DorsalDif1*, *cactus-like*, рициновых лектинов *LdRBLk*, *RBLn*, антимикробных белков: аттацин (*attacin-34*), тенецин (*tenecin-3*), холотрицин (*holotricin-3*), перлюцин (*perlucin*). Как контроль снижения экспрессии гена при грибной инфекции была измерена экспрессия гена каталазы (*Catalase-56*) (характеристики по базам данных NCBI: LOC111516285, мРНК XM_023172456.1, белок XP_023028224.1). В качестве референсных использованы гены рибосомальных белков 4 и 18 (*RpL4* и *RpL18*) и ген АДФ-рибозилирующего фактора-19 (*Arl19*) (Shi et al., 2013). Последовательности праймеров приведены в Приложении Таблица 1. Свойства праймеров (способность образовывать вторичные структуры и температура плавления) проверялись на олиго-калькуляторе OligoAnalyzer на сайте eu.idtdna.com (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Праймеры были синтезированы в фирме Биоссет (ООО Биоссет, Новосибирск, Россия).

2.3. Изменение экспрессии исследуемых генов при грибной инфекции и различных видах стресса

2.3.1. Схема эксперимента

В эксперименте использованы личинки IV возраста (2–4 ч после линьки). Для топикальной грибной инфекции личинкам наносили на дорсальную часть на 60 с 5 мкл водно-твинной (0,03% Твина-20) суспензии конидий гриба *M. robertsii* (P-72) 4×10^8 конидий/мл (2×10^6 конидий/личинку). Остаток суспензии удаляли тонкой полоской фильтровальной бумаги. Для термического ожога к дорсальной части личинок прикасались разогретой (не раскалённой) в пламени спиртовки иглой шприца. Воздействие было кратковременным, до появления изменения оттенка кутикулы личинки. Для химического ожога на дорсальную часть личинки наносили 5 мкл 15% соляной кислоты (HCl) на 60 с. Остатки кислоты удаляли тонкой полоской фильтровальной бумаги. В варианте «ампутация» у личинки

отрезали диститарсус передней правой лапки. В контроле личинкам капали на дорсальную часть 5 мкл стерильного физраствора с 0,03% Твина-20, остатки которого через 60 с удаляли тонкой полоской фильтровальной бумаги.

Далее личинок помещали в 300-милитровые вентилируемые пластиковые контейнеры (10 особей на контейнер) и содержали как указано выше. Смертность регистрировали ежедневно в течение 10–12 суток; в 4–5 повторностях (1 повторность = 10 личинок). Через 24 часа был проведён отбор тканей жирового тела и кутикулы для кПЦР. Для каждого варианта эксперимента использовано 6 биологических повторностей (1 повторность = 3 личинки).

2.3.2 кПЦР

Отбор образцов тканей, выделение суммарной РНК, ДНКазная обработка суммарной РНК и перевод РНК в кДНК осуществлялись аналогично вышеописанным в пунктах 2.2.2–2.2.5.

кПЦР проводили согласно описанию в пункте 2.2.6 со следующими изменениями. Были исследованы целевые гены: транскрипционные факторы *NFkB*, *DorsalDif1* и *Stat*, эффекторы: акалолептин (*aca-17*), аттацин (*attacin-34*), рицин-подобный β -лектин k (*LdRBLk*), одорант-связывающий белок (*OBP*) и белки теплового шока 70 и 90 (*hsp70* и *hsp90*). В качестве референсных использованы гены рибосомальных белков 4 и 18 (*RpL4* и *RpL18*) и ген АДФ-рибозилирующего фактора-19 (*Arl19*) (Shi et al., 2013). Последовательности праймеров приведены в Приложении (табл. 1). Праймеры были синтезированы в фирме Биоссет (ООО Биоссет, Новосибирск, Россия).

2.4. Биоинформатический анализ R-лектинов колорадского жука (LdRBLs)

2.4.1. Анализ первичной нуклеотидной и аминокислотной последовательностей

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности пептидов, содержащих рицин-подобный β -трелистниковый лектиновый домен (ricin-type β -trefoil lectin domain) (pfam00652 название домена в базе консервативных доменов NCBI) искались при помощи алгоритма BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) в базах данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) Национального Института Здоровья США (ncbi.nlm.nih.gov). Были использованы две базы данных – база нуклеотидных коллекций (Nucleotide collection (nr/nt)), в которой представлены охарактеризованные и неохарактеризованные по белковому продукту гены, ограниченные рамками считывания (ORF) и последовательности их мРНК и база транскриптомных контигов (Transcriptome Shotgun Assembly (tsa)), в которой представлены протяжённые последовательности нуклеотидов, полученные в ходе транскриптомных исследований.

Для LdRBLk (TSA: GEEF01084863.1) был проведён более подробный анализ аминокислотной последовательности в следующих программах. Открытая рамка считывания (ORF), первичная, вторичная и третичная структуры были проанализированы с помощью инструмента трансляции ExPASy.org (ExPASy Bioinformatics Resource Portal Translate Tool. <https://web.expasy.org/translate/>), SOPMA (Geourjon and Deléage, 1995) (Prabi-Gerland Rhone-Alpes Bioinformatic Pole Garland Site Sopma Secondary Structure Prediction Method. https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html), SWISS-MODEL (Biozentrum SWISS-MODEL. <https://www.swissmodel.expasy.org/>) и ORFfinder (NCBI BLAST). Для исследования принадлежности домена pfam00652 к сигнальным пептидам была использована онлайн-программа SignalP-5.0 Server (Almagro Armenteros et al., 2019) (Center of Biological Sequence Analysis SignalP-5.0 Server. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). Наличие трансмембранных участков прогнозировали с помощью онлайн-программы TMpred (Ikeda et al., 2003)

(ExPASy Bioinformatics Resource Portal Prediction of Transmembrane Regions and Orientation. http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html). Кроме того, вторичная структура, третичная структура и сайт связывания лиганда прогнозировали с помощью онлайн-программы I-TASSER (Roy et al., 2010; Yang et al., 2015a; Yang et al., 2015b) (Zhang Lab I-TASSER Protein Structure and Function Predictions. <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Гидрофильность и гидрофобность пептида LdRBLk анализировали с помощью онлайн-программы ProtScale, используя алгоритмы Кайта–Дулиттла (Kyte–Doolittle) и Хоппа–Вудса (Hopp–Woods) (Gasteiger et al., 2005) (ExPASy Bioinformatics Resource Portal ProtScale Tool. <https://web.expasy.org/protscale/>). На основании работы Нэшмана и Кроуэлла (Nashman and Crowell) (Nachman and Crowell, 2005) скорость мутаций (μ) оценивали как $\mu = k/(2 t Lbp)$, где k – количество точечных замен на сайт, t – время, прошедшее с момента формирования популяций *L. decemlineata* и измерения их в поколениях, а Lbp – длина исследуемого сайта в парах оснований.

2.4.2. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей R-лектинов (LdRBLs)

Было проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей пяти групп лектинов для выявления связи LdRBLk с другими пептидами *L. decemlineata*, содержащими домен лектина RBL (pfam00652), и вероятной гомологии LdRBLs и RBL рицинового токсина растения *R. communis*. В анализ были взяты пять групп аминокислотных последовательностей. Первая группа включала R-лектины лактобактерий, которые являются кишечными ассоциатами *L. decemlineata* (Kryukov et al., 2019), и бифидобактерий в качестве референса. Вторая группа включала R-лектины грибов *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, 1858, поскольку это патоген картофеля. Третья группа включала R-лектины насекомых отряда Coleoptera и все паралоги *L. decemlineata* (LdRBLk, XP_023029736.1, XP_023029739.1 и XP_023029750.1), *T. castaneum* и *A. verrucosus*. Четвёртая группа состояла из растительных лектинов, в которых домен β -лектина рицинового типа трехлистник (trefoil) (pfam00652) был

объединён с доменом семейства гликозилгидролаз 5 (GH5), включая три представителя семейства паслёновых (*S. tuberosum*, *S. chilense* и *Capsicum chinense*) и ассоциированный с гликозилгидролазой RBL из *R. communis*. Пятая группа лектинов с доменной архитектурой, аналогичной RBL токсина рицин *R. communis* (RIP-домен и удвоенный рицин-B-лектиновый домен), была дополнена гомологичными лектинами из белковых токсинов *Viscum album*, *Viscum coloratum* и *Camellia sinensis*. Всего было проанализировано 25 аминокислотных последовательностей с общей длиной в 632 аминокислоты.

Поиск паралогов LdRBLk проводился с помощью онлайн-программы BLASTp (National Center for Biotechnology Information BLAST. Standard Protein BLASTp. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.) и доменов белков в базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information SPARCLE. Architecture Viewer. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/sparcle/archview.html?archid=10624646#top>). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей выполнялось в онлайн-программе MAFFT (v7.471) (EMBL-EBI MAFFT. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>) (Waterhouse et al., 2009). Филогенетические связи между аминокислотными последовательностями белков и пептидов были реконструированы с помощью метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood), реализованного в программе MEGA X (Kumar et al., 2018). Модель Уилана и Голдмана +F (Whelan and Goldman + Freqs (WAG + F)) была признана оптимальной моделью для описания характера замен аминокислотных последовательностей (минимальный BIC составил 26590,987, а минимальный AICc – 26262,149). Надёжность узлов оценивали методом бутстрепа с 500 псевдорепликациями (Whelan and Goldman, 2001).

2.5. Влияние β -лектина рицинового токсина (RBL) из *R. communis* на прорастание конидий *M. robertsii* и *B. bassiana*

2.5.1. Дозо-зависимое влияние RBL *R. communis* на прорастание конидий *M. robertsii* и *B. bassiana*

В анализе мы использовали коммерчески доступный β -лектин А (RBL) из агглютиниона *R. communis* (клещевины обыкновенной) RCA120 (#L7886, Sigma-Aldrich, Мюнхен, Германия), поскольку оба белка (LdRBLk и RBL) имеют схожую третичную структуру и одинаковую лигандную специфичность: галактозу и N-ацетил-D-галактозамин (Рис.14 и Приложение. Рис. 2). Водный раствор RBL разбавляли до конечных концентраций 100, 50, 25 и 12,5 мкг/мл к питательной среде: 1/4 среды Сабуро-декстрозный бульон с дрожжевым экстрактом (10,0 г декстрозы, 2,5 г неопептона и 2,5 г дрожжевого экстракта) (1/4SDAY). В качестве контроля к среде добавляли стерильную воду. Среду разливали по 1,5-мл пробиркам Эппендорфа в объеме 500 мкл. В пробирки добавляли 20 мкл водно-твиновой суспензии конидий *M. robertsii* и *B. bassiana* (5×10^7 конидий/мл). Для каждой концентрации RBL использовали по три повторности. Пробирки инкубировали в горизонтальном положении при температуре 25 °С и скорости вращения 190 об/мин. Через 36 часов инкубации под световым микроскопом подсчитывали количество проросших и непроросших конидий. Для каждой повторности просматривали не менее 10 полей зрения со 100 конидиями.

2.5.2. Световая микроскопия конидий *M. robertsii* при культивировании с RBL *R. communis*

Водный раствор RBL добавляли к питательной среде 1/4SDAY до конечной концентрации 75 мкг/мл. В качестве контроля к среде добавляли стерильную воду. Среду разливали по 10 мл в флаконы объемом 25 мл. В среду добавляли 400 мкл водно-твинной (0,03% Твин-20) суспензии конидий *M. robertsii* P-72 (5×10^7 конидий/мл). Инкубировали на качалке в горизонтальном положении при температуре 25 °С и скорости вращения 190 об/мин. Через 24 часа проводили

визуализацию формирования мицелия *M. robertsii* с помощью световой микроскопии.

2.5.3. Формирование склероциев *M. robertsii* при культивировании с RBL *R. communis*

Водный раствор RBL добавляли к питательной среде 1/4SDAY до конечной концентрации 75 мкг/мл. В качестве контроля к среде добавляли стерильную воду. Среду разливали по 15 мл в колбы объемом 50 мл. В среду добавляли 300 мкл водно-твинной (0,03% Твин-20) суспензии конидий *M. robertsii* P-72 (5×10^7 конидий/мл). Инкубировали на качалке при температуре 25 °C и скорости вращения 190 об/мин. Через 4 суток оценивали формирование мицелия и склероциев *M. robertsii*.

2.5.4. Электронная микроскопия гифальных тел *M. robertsii* при культивировании с RBL *R. communis*

Водный раствор RBL добавляли к питательной среде 1/4SDAY до конечной концентрации 75 мкг/мл. В качестве контроля к среде добавляли стерильную воду. Среду разливали по 10 мл в вials объемом 25 мл. В среду добавляли 400 мкл водно-твиновой (0,03% Твин-20) суспензии конидий *M. robertsii* P-72 (5×10^7 конидий/мл). Инкубировали на качалке в горизонтальном положении при температуре 25 °C и скорости вращения 190 об/мин. Через 24 часа промытые бластоспоры помещали в фиксатор (2,5% об. глутаральдегида в 0,1 М какодилатном буфере, pH = 7,4). Образцы промывали какодилатным буфером и дополнительно фиксировали в 1% масс. OsO₄ в 0,1 М какодилатном буфере, pH = 7,4. Затем их обезвоживали в восходящей серии этанола и ацетона, заливали смесью Epon-Araldite 812 и разрезали на ультратоме Reichert Ultracut S (Leica, Nussloch, Германия). Срезы окрашивали цитратом свинца и ацетатом уранила и наблюдали с помощью электронного микроскопа Hitachi-300 или JEM-100CX (Kryukov et al., 2020).

2.6. Влияние рекомбинантного R-лектина LdRBLk на конидии и бластоспоры *M. robertsii*

2.6.1. Синтез рекомбинантного R-лектина LdRBLk в культуре клеток насекомых

Для выявления возможных антигрибных свойств синтез рекомбинантного белка колорадского жука LdRBLk в культуре клеток насекомых был проведён в фирме ООО «Белки-Антитела». Нуклеотидная последовательность, кодирующая целевой белок, была синтезирована химическим путём. Далее нуклеотидная вставка была вставлена в вектор pFastBac1. Вектор был трансформирован в штамм *E. coli* DH10Bac для получения рекомбинантных бакмид, рекомбинантные бакмиды трансфицировали в культуру клеток насекомых (название линии не раскрывается). Для выделения рекомбинантного белка из клеточной культуры применяли стандартную очистку гистидин-меченных рекомбинантных белков на сорбенте Ni-NTA.

Нуклеотидная последовательность R-лектина LdRBLk предоставленная нами фирме «Белки-Антитела» состоит из 387 нуклеотидов: «ATGTCAGGTATTCGGATCATATCGAAATTATCTGGATTAGCTTTGGATGGA AATGGGAGCAACGTCAAAGCAGCAATGCCTAATAACACCGTTGGCCAAATT TGGTCTCTGGAAAGTTTGGGAGATGGAACSTTTTGT CATACACAGTTATTCAG ACAAGAACATGGTACTAGATATTGAATATGGCTGCCATGGCGAAAATATCA TACTATATCCAAGACATGGTGACGACAATCAACAGTTCTACATCAATTCTGA CGGGACAATTGTATCAGCTGGTGACAGACAGAAGGTTTTGCAAATGGTTAG AGGAAAAGTCGTGGTGCGACCAGTGAACATTTTCGAGGAATGTCTGATCACAT TTTCAACATCGAGCAACTATTT».

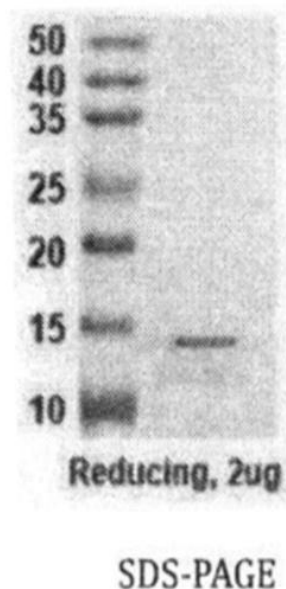


Рис. 8. Электрофорез рекомбинантного лектина LdRBLk, предоставленный коммерческим производителем ООО «Белки-Антитела».

Рекомбинантный белок был получен в виде лиофилизированного образца, привезённого и хранящегося при -20°C . Полученный лиофилизированный белок был охарактеризован фирмой производителем при помощи SDS-page электрофореза (Рис. 8).

2.6.2. Влияние рекомбинантного R-лектина LdRBLk на прорастание конидий *M. robertsii*

Рекомбинантный белок растворяли в стерильном физиологическом растворе непосредственно перед добавлением в жидкую питательную среду 1/4SDAY с бластоспорами *M. robertsii* P-72. При этом в контрольные образцы добавляли равный объём стерильного физиологического раствора. Были исследованы конечные концентрации 20 мкг/мл, 10 мкг/мл, 5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 0,1 мкг/мл. Культивирование проводили в виалах. К 1,6 мл среды 1/4SDAY добавляли 200 мкл бластоспор *M. robertsii* ($4,2 \times 10^8$ конидий/мл) и 200 мкл раствора R-лектина LdRBLk (от максимальной концентрации 200 мкг/мл до 1

мкг/мл). Инкубацию проводили в течение 12 часов при 25 °С и 190 об/мин. Прорастание конидий оценивали под световым микроскопом.

2.6.3. Оценка структурных изменений клеточной стенки гриба *M. robertsii* методом атомно-силовой микроскопии

Атомно-силовая микроскопия проводилась в институте X-bio на базе Тюменского Государственного Университета (ТюмГУ). В лаборатории антимикробной резистентности проводили культивирование грибной культуры и подготовку образца (работу курировал к.б.н. А.С. Васильченко). В научно-образовательном центре «Нанотехнологии» проводили микроскопию на зондовом микроскопе NT-MDT NTegra Aura (работу курировал к.т.н. А.Н. Бобылев).

Для оценки влияния рекомбинантного R-лектина LdRBLk на прорастание бластоспор *M. robertsii* проводили культивирование гриба в присутствии рекомбинантного лектина на качалке (12 ч, 25 °С, 160 об/мин). Для этого в виалы с 2 мл среды 1/4SDAY добавляли 100 мкл бластоспор *M. robertsii* (4.4×10^5 конидий/мл) и 190 мкл раствора рекомбинантного лектина LdRBLk для создания конечной концентрации 8.3 мкг/мл. В контрольный вариант добавляли 190 мкл физиологического раствора. Через 12 ч роста бластоспоры осаждали в 1.5 мл пробирках при 3 000 g 5 мин, дважды отмывали в 200 мкл стерильной воды с последующим осаждением при 1 500 g 5 мин в первый раз и при 5 000 g 5 мин – второй раз. Осадок ресуспендировали в 10 мкл стерильной воды. Непосредственно перед просмотром образца подготавливали подложку согласно работе А.А. Степанова (2022): из минеральной слюды вырезали квадрат со стороной около 9 мм, наклеивали его на такой же квадрат двустороннего скотча и с другой стороны скотча приклеивали шайбу из оцинкованной стали с внешним диаметром 8 мм и толщиной 0,9 мм. Верхний слой слюды расслаивали для получения свежего слома, на который наносили 10 мкл исследуемого образца. Образец сушили в ламинаре под потоком воздуха без ультрафиолета около 10 минут.

Микроскопию проводили на зондовом микроскопе NT-MDT NTegra Aura (Stepanov et al., 2022). Обработку изображений проводили с помощью программы NT-MDT Nova RC1 под руководством А.Н. Бобылева (ТюмГУ).

2.7. РНК-интерференция целевых генов: влияние на выживаемость личинок, восприимчивость к грибной инфекции и экспрессию генов иммунного ответа

2.7.1. Подбор и синтез целевых дцРНК

В качестве целевых генов для РНК интерференции были выбраны гены транскрипционных факторов иммуносигнальных путей Stat и Toll; и ген эффектора *LdRBLk*. Ген *Stat*, имеющий в 3.0 версии генома *L. decemlineata* номер гена LOC111509439 и номер мРНК XM_023165198.1. Ген эффектора *LdRBLk* не получил в 3.0 версии генома *L. decemlineata* характеристики номера гена, что можно объяснить тем, что он находится на «отрицательной» цепи ДНК, тогда как большинство охарактеризованных генов кодируются на «положительной» цепи ДНК. Поэтому последовательности праймеров для дцРНК подбирались по номеру гена в базах TSA: GEEF01084863.1, мРНК реконструированна по ORF.

Транскрипционный фактор Toll-пути в 3.0 версии генома колорадского жука представлен в нескольких паралогах, названных *DorsalDif1* номер гена LOC111503735 и *DorsalDif2* с номером гена LOC111516171. При этом с гена *DorsalDif2* (LOC111516171) нарабатывается 3 белковых изоформы (мРНК: XP_074038059.1, XP_074038060.1, XP_074038061.1) имеющие протяжённые консервативные участки (Приложение. Рис. 4), на которые и были подобраны праймеры для наработки дцРНК. Для РНК интерференции были выбраны оба гена *DorsalDif1* и *DorsalDif2* и при инъекциях использовалась их равная смесь.

В качестве контрольного гена для инъекции дцРНК был взят ген зелёного флуоресцентного белка (англ. green fluorescent protein, *GFP*), белка, выделенного из медузы *Aequorea victoria* Murbach & Shearer, 1902 (Chalfie et al., 1994). Ген GFP был лигирован в pAL2-T вектор, который был трансформирован в грибной штамм MB-1 *B. bassiana*, в лаборатории молекулярной защиты растений ВИЗР РАН.

Трансформированный штамм был любезно предоставлен лаборатории экологической паразитологии ИСиЭЖ СО РАН.

На основе нуклеотидных последовательностей из баз данных NCBI для мРНК колорадского жука были подобраны праймеры для синтеза дцРНК для РНК интерференции. Последовательности праймеров представлены в таблице (Приложение. Таб. 2). Праймеры были синтезированы как в варианте полностью комплементарном к генам колорадского жука, так и в варианте с добавлением к 5' концу последовательности для T7 промотора (5'- ТААТАСГАСТСАСТАТАGГГ - 3'). Промотор T7 – ключевой элемент узнавания для РНК-полимеразы T7, которая специфически иницирует синтез РНК и позволяет синтезировать дцРНК по матрице ДНК (одно или двухцепочечной). Синтез праймеров был проведён в фирме Биоссет (Новосибирск, Россия).

На матрице комплементарной ДНК (кДНК) колорадского жука полученной в предыдущих экспериментах (пункты 2 и 3) были проведены реакции ПЦР для проверки на работоспособность последовательности праймеров не содержащих T7-промотор. В смеси ПЦР использовали праймеры в концентрации 0,2 мМ каждого, 5 мкл кДНК (или воду в безматричном контроле) и набор для проведения классической ПЦР БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс, Новосибирск, Россия). Условия ПЦР: 95 °С – 3 мин; 40 циклов: 95 °С – 15 с, 62 °С – 40 с; 70 °С – 1 мин. Качество пцр-продуктов проверяли электрофорезом в 1% агарозном геле с бромистым этидием 0,5 мкг/мл в буфере ТАЕ 1× (40 mM Трис-(гидроксиметил) аминотетан, 5 mM ЭДТА, 20 mM уксусная кислота, pH = 8,3). Все пцр-продукты были единственными в реакции, без примесей димеров.

2.7.2. Нарботка пцр-продукта по праймерам с последовательностью промотора T7

Проводили ПЦР с полноразмерными праймерами (содержащими последовательность промотора T7) и кДНК в качестве матрицы аналогично вышеописанным условиям (2.7.1.). Весь наработанный ПЦР продукт наносили на агарозный гель с бромистым этидием 0,5 мкг/мл, фрагменты геля с пцр-

продуктом вырезали под контролем ультрафиолетового излучения на трансиллюминаторе, помещали в пробирки объёмом на 1,5 мл и хранили при температуре -20 °С до дальнейшего использования.

2.7.3. Очистка пцр-продукта из агарозного геля

Очистку пцр-продукта из агарозного геля проводили через обрезанный фильтр наконечника с фильтром на 1 мл. Обрезанный наконечник помещали в новую пробирку объёмом на 1,5 мл, в верхнюю его часть закладывали кусочек замороженного геля и центрифугировали при 12 000 g 90 с при комнатной температуре. Фильтрат разделяли по 300 мкл, к каждому образцу добавляли по 33 мкл 3М ацетата натрия, 5,5 мкл гликогена 20 мг/мл (Thermo Scientific) и перемешивали содержимое пробирок переворачиванием. Далее добавляли по 750 мкл 75% этанола и помещали для преципитации ДНК на 2 часа при -20 °С. Потом образцы центрифугировали при 10 000 g 20 мин при комнатной температуре, супернатант отбрасывали. Осадок отмывали от солей добавляя 300 мкл 70% этанола, прокручивание пробирки в руках и далее центрифугируя при 10 000 g 10 мин при комнатной температуре и супернатант отбрасывали. Промывку повторяли с использованием 180 мкл 70% этанола и центрифугировали при тех же условиях. После удаления супернатанта сбрасывали капли в центрифуге в течение 5 с, осадок сушили при комнатной температуре 5 мин. Осадок растворяли в 20 мкл воды обработанной ДЕПК. Всего было четыре типа пцр-продукта – по праймерам на *DorsalDif1*, *DorsalDif2*, *Stat* и *LdRBLk*.

2.7.4. Синтез дцРНК на матрице ПЦР-продуктов

Синтез проводили с помощью набора для проведения Т7-транскрипции *in vitro* (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия). Реакционная смесь, общим объёмом 50 мкл, содержала 10 мкл 5× буфера, 2мкл 25× ДДТ, 2 мкл смеси rNTP (25 мМ каждого нуклеотида (АТР, УТР, СТР, ГТР)), 10 мкл ДНК матрицы (очищенный пцр-продукт), 1 мкл Т7 РНК-полимеразы, 25 мкл воды. Реакционные смеси в стрипах на 200 мкл, помещали в амплификатор БИС М111-02-96 (БИС-Н,

Кольцово, Россия) и инкубировали по программе: 37 °С – 16 ч, 75 °С – 15 мин, при температуре крышки 100 °С. Затем к каждому образцу добавляли по 0,6 мкл фермента ДНКаза I, без РНКазной активности (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия) и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. После этого синтезированную дцРНК сразу же чистили на колонках от примесей реакционной смеси.

2.7.5. Очистка дцРНК на колонках

Очистка дцРНК проводилась на колонках набора Махи для выделения ДНК и РНК из реакционных смесей (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия) согласно протоколу для набора. К 50 мкл реакционной смеси с Т7 РНК-полимеразой добавляли 250 мкл раствора РВ, пипетировали и наносили на колонку. Центрифугировали 30 сек при 10 000 g, фильтрат отбрасывали, колонку сушили на центрифуге 3 мин при 10 000 g. Колонку переносили в новую пробирку на 1,5 мл и наносили на центр колонки 80 мкл буфера для элюции EBR (вода, очищенная от РНКаз). Инкубировали при комнатной температуре 3 мин, центрифугировали 1 мин при 10 000 g. Повторно наносили на колонку ещё 80 мкл буфера для элюции EBR, также инкубировали 3 мин при комнатной температуре и центрифугировали 1 мин при 10 000 g. 160 мкл полученного элюата или хранили при -20 °С или охлаждали на льду и в течение 1-2 часов инъецировали личинкам колорадского жука. Проверку качества и количества дцРНК проводили при помощи электрофореза в 1% агарозном геле в буфере TBE 1× (1-кратный буфер содержит 89 мМ Трис-(гидроксиметил) аминметан, 89 мМ борную кислоту и 2 мМ ЭДТА, рН = 8,3) и контроля на трансиллюминаторе.

2.7.6. Инъекции дцРНК и заражение грибным патогеном личинок колорадского жука

Инъекцию проводили шприцами на 100 мкл с несъёмной иглой в четвёртый дорсальный сегмент личинки IV возраста (2–4 ч после линьки). Шприц помещали в микроинжектор, который настраивали на дозировку 4 мкл инъекции за одно нажатие. Средняя концентрация дцРНК была около 0,25 мкг/мкл, таким образом

за одну инъекцию вводили около 1 мкг дцРНК на личинку. После инъекции дцРНК личинок рассаживали в 300-милитровые вентилируемые пластиковые контейнеры, по 5 особей на контейнер. Через 3 часа после инъекции часть личинок перкутанно заражали погружением в водно-твинную (Твин-20 – 0,03%) суспензию конидий гриба *B. bassiana* (штамм Sar-31, титр 2×10^6 конидий/мл) на 15 с, а часть оставляли без заражения. В качестве контролей использовали личинок, инъецированных соответствующей концентрацией дцGFP и инъецированных дцGFP с последующим заражением той же суспензией *B. bassiana*. Личинок содержали при температуре 24 °С и свето-темновом режиме 16:8 ч (свет:темнота). Кормление проводили как описано выше (раздел 2.1). Смертность определяли в течение 10 суток. Биотесты проведены в 6–8 повторностях (1 повторность = 5 личинок) и регистрировали ежедневно. Через 72 часа был проведён отбор тканей жирового тела. Для кПЦР использовано 6 биологических повторностей каждого варианта эксперимента (1 повторность = 3 личинки).

2.7.7 кПЦР

Отбор образцов тканей, выделение суммарной РНК, ДНКазная обработка суммарной РНК и перевод РНК в кДНК осуществлялись аналогично вышеописанным в пунктах 2.2.2–2.2.5.

кПЦР проводили аналогично описанию в пункте 2.2.6 со следующими изменениями. Была исследована экспрессия генов-мишеней дцРНК: *NFkB*, *DorsalDif1*, *STAT*, рицин-подобный β -лектин k (*LdRBLk*), а также *DorsalDif2* и рицин-подобного β -лектина n (*RBLn*). В качестве референсных использованы гены рибосомальных белков 4 и 18 (*RpL4* и *RpL18*) (Shi et al., 2013). Последовательности праймеров приведены в Приложение (табл. 1). Праймеры были синтезированы в фирме Биоссет (ООО Биоссет, Новосибирск, Россия).

2.8. Статистика

Различия в динамике смертности насекомых оценивали с помощью анализа выживаемости Каплана-Майера (Kaplan-Meier) (log-rank test). Данные по экспрессии генов представлены на графиках в виде средних арифметических значений и стандартных ошибок (SE). Так как они имели преимущественно ненормальное распределение (тест Шапиро-Уилка: $p < 0,05$), то анализировались с помощью теста Данна (Dunn's test). Различия в скорости прорастания конидий анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Для статистического анализ и визуализации данных использованы программы PAST 3, SigmaStat 3.5, Statistica 8.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

После инфицирования личинок тремя видами грибов (*M. robertsii*, *B. bassiana* и *C. fumosorosea*) смертность достигала 95 – 100% на 12 сутки, тогда как в контроле гибель не превышала 3% (Рис. 9). При этом динамика смертности существенно различалась после инфицирования указанными патогенами. Так, после инфицирования *C. fumosorosea* (Pad-39) медианное летальное время (LT₅₀) составило 5±0,5 сут, а после инфицирования *B. bassiana* (Sar-31) и *M. robertsii* (MB-1) – 6±0,5 сут и 8±0,5 сут соответственно ($\chi^2 > 5,167$, $df = 3$, $p < 0,023$). Симптомы активной инкапсуляции патогенов – меланистические пятна под кутикулой – появлялись на насекомых на 3 сут после инфицирования.

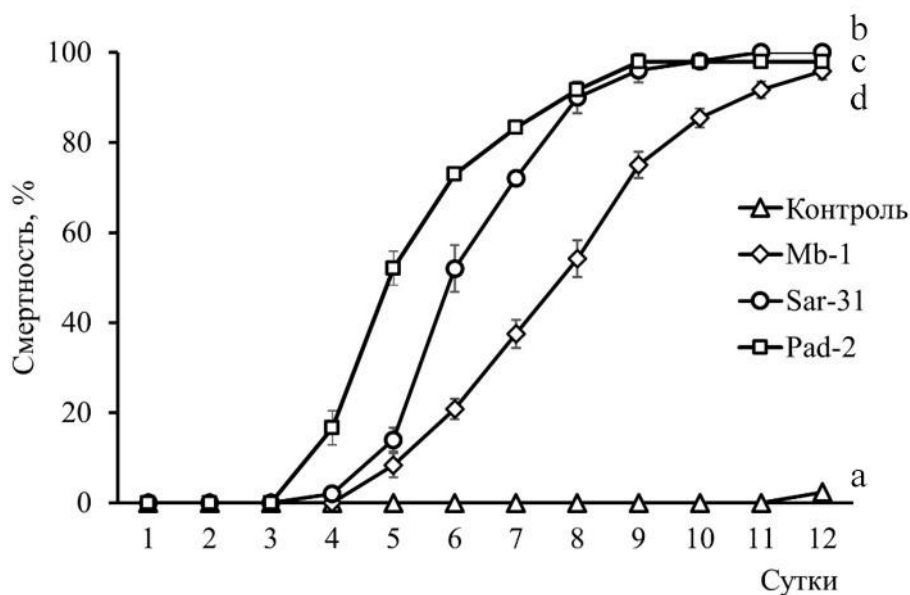


Рис. 9. Смертность личинок колорадского жука после инфицирования энтомопатогенными грибами *M. robertsii* (штамм MB-1), *B. bassiana* (штамм Sar-31), *C. fumosorosea* (штамм Pad-39) (2×10^6 конидий/мл). Существенные различия в динамике смертности указаны разными буквами (логранк тест, $\chi^2 > 5,167$, $df = 3$, $p < 0,023$).

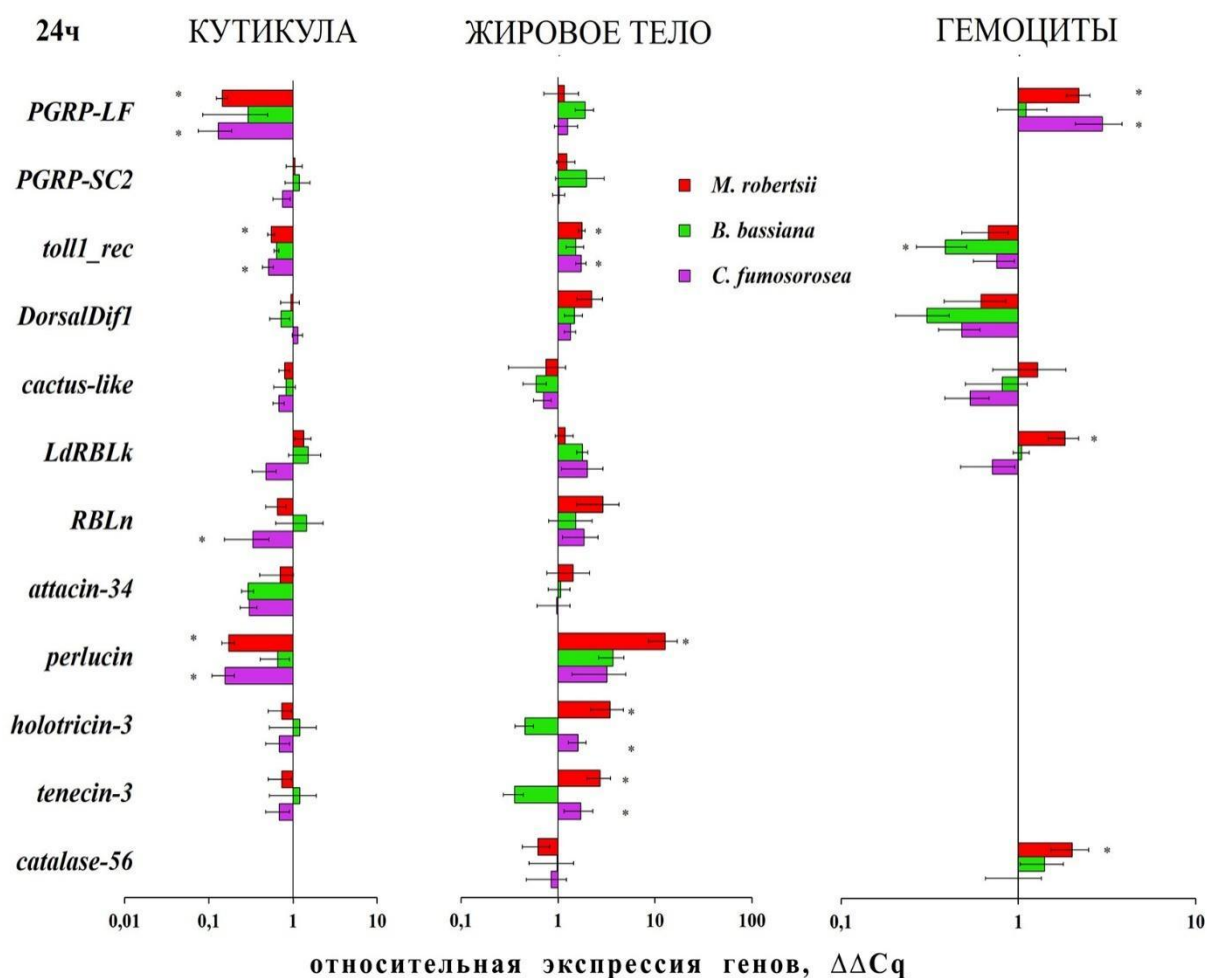


Рис. 10. Изменения экспрессии генов иммунного ответа у личинок колорадского жука в тканях кутикулы, жирового тела и гемоцитах через 24 часа после инфицирования *M. robertsii*, *B. bassiana* и *C. fumosorosea* (2×10^6 конидий/мл). Экспрессия генов нормирована на контрольный вариант и на референсные гены: рибосомальные белки 4 и 18 (*RpL4*, *RpL18*) и ген АДФ-рибозилирующего фактора-19 (*Arl19*); расчёт по методу $\Delta\Delta Cq$. * – достоверные отличия от контрольного варианта (тест Данна, $p < 0,05$).

Через 24 часа после заражения (до появления меланистических пятен) регистрировалось относительно слабое изменение экспрессии генов во всех исследуемых тканях (Рис. 10). Диапазон изменений в экспрессии не превышал 13-кратного значения. Экспрессия генов *PGRP-SC2*, *RBLn* и исследованных генов

АМП в гемоцитах контрольных личинок находилась ниже порога детекции методом кПЦР.

В тканях кутикулы в ответ на *M. robertsii* и *C. fumosorosea* пятикратно снижалась экспрессия генов *PGRP-LF*, почти двукратно Toll-рецептора и десятикратно перлюцина (тест Данна $p < 0,05$ относительно контроля). В ответ на инфекцию *B. bassiana* существенных изменений в экспрессии генов не зарегистрировано.

В жировом теле достоверно повышалась экспрессия генов рецептора Toll, перлюцина и антигрибных пептидов: холотрицина-3 и тенецина-3 в ответ на заражение *M. robertsii* (в 2, 12,7, 3,4 и 2,7 раз соответственно; $p < 0,05$ по сравнению с контролем). Сходный, но менее выраженный эффект наблюдался в ответ на инфекцию *C. fumosorosea*. Заражение *B. bassiana* не приводило к существенным изменениям в экспрессии генов относительно контроля.

В гемоцитах наиболее сильный ответ в экспрессии генов также зафиксирован в ответ на *M. robertsii* – достоверно увеличивалась экспрессия генов *PGRP-LF*, *RBLk* и *catalase-56* (в 2,2, 1,8 и 2,0 раза соответственно, $p < 0,05$ относительно контроля). Инфекция *C. fumosorosea* приводила только к апрегуляции гена *PGRP-LF*, а *B. bassiana* – к даунрегуляции гена рецептора Toll-пути *toll1_rec* ($P < 0,05$ относительно контроля).

Таким образом, через 24 часа после инфицирования диапазон изменения экспрессии генов в исследуемых тканях не превышал 13-кратных различий и они были наиболее выраженными в ответ на инфицирование *M. robertsii*, но не в ответ на инфекцию *B. bassiana*. *M. robertsii* продемонстрировал более низкую вирулентность. Инфекция наиболее вирулентного гриба – *C. fumosorosea* приводила к промежуточным эффектам в изменении экспрессии генов.

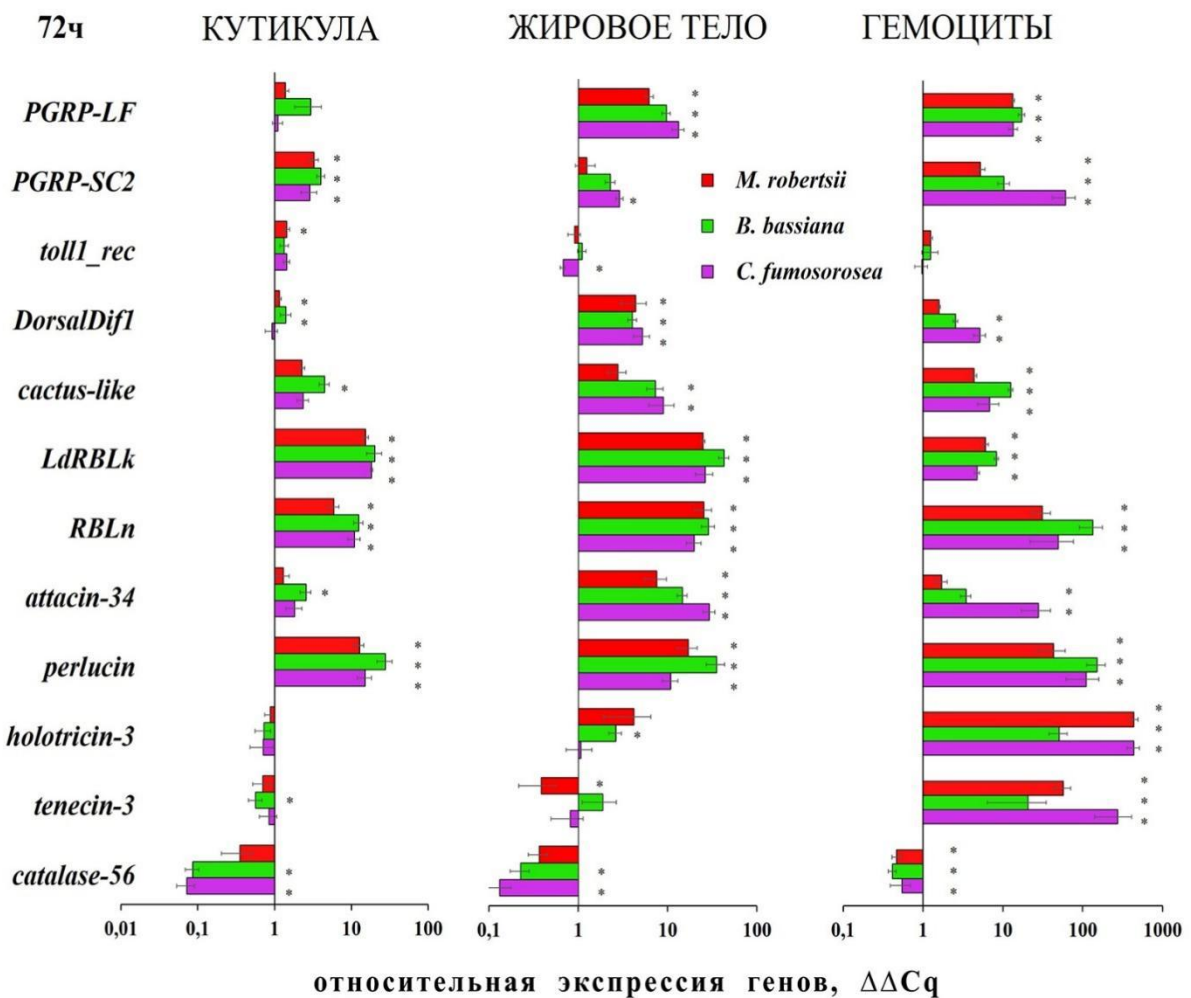


Рис. 11. Изменения экспрессии генов иммунного ответа у личинок колорадского жука в тканях кутикулы, жирового тела и гемоцитах через 72 часа после инфицирования *M. robertsii*, *B. bassiana* и *C. fumosorosea* (2×10^6 конидий/мл). Экспрессия генов нормирована на контрольный вариант и на референсные гены: рибосомальные белки 4 и 18 (*RpL4*, *RpL18*) и ген АДФ-рибозилирующего фактора-19 (*Arl19*); расчёт по методу $\Delta\Delta Cq$. * – достоверные отличия от контрольного варианта (тест Данна, $p < 0,05$).

Иная картина регистрировалась через 72 часа после заражения, на стадии активной инкапсуляции. На этом этапе наблюдался значительно более выраженный ответ в экспрессии генов иммунитета во всех исследуемых тканях (Рис. 11). При этом в гемоцитах регистрировались наиболее высокая кратность изменений экспрессии по сравнению кутикулой и жировым телом.

В кутикуле все три инфекции приводили к существенному (4–20-кратному) подъёму генов *LdRBLk*, а также *PGRP-SC2* и *perlucin*. Аналогичный эффект наблюдался для гена *RBLn*. Существенная апрегуляция гена *toll1_rec* регистрировалась только в ответ на *M. robertsii*, *DorsalDif1* – в ответ на *M. robertsii* и *B. bassiana*, а *cactus-like* и *attacin-34* – в ответ только на *B. bassiana*. Для гена *catalase-56* отмечено существенное снижение экспрессии при развитии инфекций *B. bassiana* и *C. fumosorosea*.

В жировом теле все три инфекции приводили к существенному, 31- и 24-кратному, подъёму экспрессии генов *LdRBLk* и *RBLn*, а также 4,5-кратному подъёму *DorsalDif1*. Повышение экспрессии генов *PGRP-LF*, *cactus-like* и *attacin-34* было статистически значимым после инфицирования *B. bassiana* и *C. fumosorosea*. Значимый подъём *perlucin* регистрировался при развитии инфекций *M. robertsii* и *B. bassiana*. Ген *catalase-56*, как и в кутикуле, показал снижение экспрессии при инфекциях.

В гемоцитах все три инфекции приводили к значимому, 50-, 12- и 15-кратному повышению экспрессии генов *RBLn*, *cactus-like* и *PGRP-LF*. Существенная апрегуляция *LdRBLk* регистрировалась в ответ на *M. robertsii* и *B. bassiana*. Инфицирование *B. bassiana* и *C. fumosorosea* значимо повышало экспрессию *PGRP-SC2*, *DorsalDif1*, *attacin-34*. Важно отметить, что гены антигрибных пептидов *holotricin-3* и *tenecin-3* показали наиболее сильную индукцию именно в гемоцитах (до 437-кратного повышения относительно контроля). При этом существенное повышение регистрировалось только в ответ на заражение *M. robertsii* и *C. fumosorosea*, но не в ответ на инфекцию *B. bassiana*. Ген *catalase-56* показал значимое снижение экспрессии под действием всех трех инфекций.

Полученные результаты позволяют выделить и обсудить несколько главных эффектов. Первый эффект: на этапе инкапсуляции патогенов (72 ч) наблюдаются наиболее выраженные изменения в экспрессии генов во всех тканях по сравнению с этапом проникновения через кутикулу (24 ч). Это свидетельствует об инкапсуляции как наиболее остром этапе «борьбы» с инфекцией. Ранее показано,

что при развитии грибных инфекций этап инкапсуляции является критическим для насекомого-хозяина, определяющим исход инфекции: выздоровление либо гибель хозяина (Chouvenec et al., 2009). Тем не менее, усиление экспрессии ряда генов в жировом теле и гемоцитах наблюдается уже на ранних этапах патогенеза при проникновении гриба через кутикулу. Так, гены *toll1_rec*, *holotricin-3*, *tenecin-3*, *perlucin* индуцировались в жировом теле, а *LdRBLk*, *catalase-56* в гемоцитах уже на раннем этапе (24 ч). Подобный подъем ряда генов иммунитета в период адгезии гриба к покровам и проникновению через кутикулу отмечен для саранчовых после инфицирования *Metarhizium acridum* (Zhang et al., 2020). Авторы показали, что в период 4–24 ч после заражения в жировом теле и гемоцитах *Locusta migratoria* происходит индукция рецепторных генов (*PGRP*), лектинов С-типа, ряда сигнальных компонентов путей Toll и IMD, а также генов, кодирующих НАДФН-оксидазы и профенолоксидазы. Это свидетельствует о «подготовке» организма хозяина к вторжению грибного патогена в гемоцель уже на ранних этапах патогенеза.

Второй эффект: наибольшие диапазоны в индукции генов наблюдаются в гемоцитах, что наиболее характерно для антигрибных пептидов (*holotricin-3*, *tenecin-3*), а также *perlucin*. Наиболее выраженное усиление генов-эффекторов иммунного ответа в гемоцитах, по сравнению с жировым телом, было установлено в работах на *G. mellonella* при инфицировании *C. albicans* и *B. bassiana* (Kaya et al., 2025; Ding et al., 2020). В исследовании на *Drosophila* (Vaibhvi et al., 2022) установлено, что жировое тело и гемоциты демонстрируют разный иммунный ответ. Реакции жирового тела включают реакции, обеспечивающие усиленный синтез и экспорт АМП. Гемоциты, с другой стороны, показали усиленные сигнатуры экспрессии генов, связанных с фагоцитозом. При этом максимальные различия между тканями было отмечено авторами в изменении экспрессии генов АМП, что согласуется с результатами нашей работы. Такой усиленный синтез АМП называют «индуцибельным», он отличается от конституционального (фонового) уровня тем, что требует наличия в регуляторной

области гена максимального количества транскрипционных факторов и энхансеров (Lim et al., 2013; Ganesan et al., 2011).

Третий эффект, важный для настоящей работы: индукция генов кодирующих R-лектины *LdRBLk* и *RBLn*, наблюдается во всех исследуемых тканях колорадского жука в ответ на заражение всеми изучаемыми грибами. Это свидетельствует в пользу их участия в антигрибном иммунном ответе.

Четвертый важный эффект – дифференциальная экспрессия генов, связанных не только с антигрибной, но и с антибактериальной защитой. В частности, мы наблюдали снижение экспрессии негативного регулятора пути IMD *PGRP-LF* в кутикуле на начальной стадии патогенеза и повышение экспрессии *PGRP-LF* и *PGRP-SC2* в разных тканях на более позднем этапе (72 ч). Кроме того, мы регистрировали подъём экспрессии гена антибактериального белка *attacin-34*. Повышение экспрессии негативных регуляторов IMD пути на этапе активной инкапсуляции возможно связано с компенсаторными функциями в иммунном ответе и согласуется с общей картиной слабой или негативной регуляцией этого пути при грибных инфекциях колорадского жука на стадии инкапсуляции (Kryukov et al., 2026). Подъем экспрессии гена *attacin-34* может свидетельствовать о сопутствующих инфекциях, вызванных проникновением грамотрицательных бактерий – ассоциантов жука через кутикулу, поврежденную энтомопатогенными грибами (Vey and Fargues, 1977), а также может свидетельствовать об эффекте управления грибом антибактериальным иммунитетом хозяина для блокирования развития вторичных бактериальных инфекций, что позволяет грибам успешно закончить жизненный цикл (Wang et al., 2024).

Пятый эффект касается различий в патогенезах, вызываемых разными видами грибов. На этапе проникновения через кутикулу мы наблюдали индукцию сигнального компонента Toll пути (*tolll_rec*) и генов эффекторов (*LdRBLk*, *holotricin-3*, *tenecin-3*, *perlucin*) в жировом теле или гемоцитах после заражения *M. robertsii*, но не *B. bassiana*. Кроме того, через 72 ч после заражения существенная ($p < 0,05$) индукция антигрибных пептидов, контролируемых Toll путем, *holotricin-3* и *tenecin-3* в гемоцитах и жировом теле регистрировалась только под действием

M. robertsii, а не *B. bassiana*. Возможно, компоненты клеточной стенки или метаболиты *B. bassiana* распознаются иммунной системой хозяина хуже, чем таковые у *M. robertsii*. Об этом также свидетельствуют более слабое и позднее появление меланистических пятен при инфекции *B. bassiana* по сравнению с *M. robertsii* (Крюков, неопубликованное наблюдение). Мы предполагаем, что данные эффекты могут быть связаны с композицией протеаз грибов. Показано, что *M. robertsii* обладает более широким набором генов, кодирующих субтилизиновые и трипсиновые протеазы, по сравнению с *B. bassiana* (Xiao et al., 2012). Также хорошо известно, что один из путей активации Toll пути лежит через распознавание протеаз грибов, таких как субтилизин-подобная сериновая протеаза (Pr1) (Krautz et al., 2014). Данная индукция происходит через сериновые протеазы хозяина, такие как Persephone (Krautz et al., 2014). Взаимосвязь между продукцией Pr1 грибом и уровнем меланизации у насекомых при развитии микозов показана на генноинженерных штаммах *Metarhizium* (St Leger et al., 1996).

Наконец, шестой эффект - снижение экспрессии гена каталазы на этапе инкапсуляции патогенов (72 ч) во всех тканях при трех инфекциях. Мы полагаем, что данное снижение может являться индикатором увеличения АКМ в частности свободной перекиси водорода и гидроксильного радикала в тканях. Увеличение АКМ вызывает окислительные стресс как у патогена, так и у хозяина. Последний, в ответ на повышение АКМ, активирует процессы аутофагии, апоптоза, фагоцитоза, инкапсуляции, нодуляции и меланизации гемолимфы (Timofeev et al., 2025; Filomeni et al., 2015). Следовательно, снижение экспрессии гена каталазы может сигнализировать о развитии активного иммунного ответа с протеканием процессов меланизации и инкапсуляции.

Таким образом, нами установлены изменения в экспрессии ряда генов иммунитета колорадского жука в зависимости от стадии патогенеза, ткани и в ряде случаев, от вида патогена. Индукция экспрессии генов рикцин-подобных β -лектинов наблюдается уже на начальной стадии микозов (24 ч после инфицирования), но наиболее выражена на этапе инкапсуляции (72 ч после

заражения). При этом индукция гена *LdRBLk* происходит во всех тканях после инфицирования всеми видами исследуемых грибов.

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

Чтобы определить, является ли повышение экспрессии рицин-подобного β-лектина *LdRBLk* специфической реакцией на грибную инфекцию, мы провели эксперименты по изучению экспрессии этого гена после топикального инфицирования *M. robertsii* (P-72) (2×10^6 конидий/личинку) и различных повреждений. Помимо *LdRBLk* были выбраны гены транскрипционных факторов (*DorsalDif1*, *NFkB*, *Stat*), антибактериальные пептиды аттацин и акалолептин (*attacin-34*, *acaloleptin-17*). Шапероны HSP (*hsp90* и *hsp70*) и одорант-связывающий белок (*obp*). Такой набор генов был взят, для того чтобы посмотреть ранний транскрипционный ответ на повреждение не только со стороны на антимикробной составляющей иммунитета, но и со стороны генов, связанных со стрессом (HSP).

После ампутации диститарсуса все личинки выживали в течение 8 суток, как и в контрольном варианте (рис.12). После химических (15% HCl) и термических ожогов низкая смертность наблюдалась только на первые и вторые сутки (13–17%). Топикальное заражение *M. robertsii* (2×10^6 конидий/личинку) привело к 60% смертности на 8-е сутки. Существенные различия в динамике смертности по сравнению с контролем регистрировались только для варианта с грибной инфекцией ($\chi^2 = 25,69$, $df = 1$, $p < 4,01 \times 10^{-7}$).

Через 24 часа после указанных воздействий зарегистрировано значительное 10-кратное увеличение экспрессии *LdRBLk* в кутикуле после термического ожога ($p < 0,0002$ по сравнению с контролем), а после обработки грибом наблюдалось 4,6-кратное усиление ($p < 0,01$ по сравнению с контролем). Несущественное увеличение экспрессии *LdRBLk* наблюдалось после химического ожога и ампутации диститарсуса ($p = 0,07$ и $p = 0,8$ по сравнению с контролем соответственно) (Рис. 13).

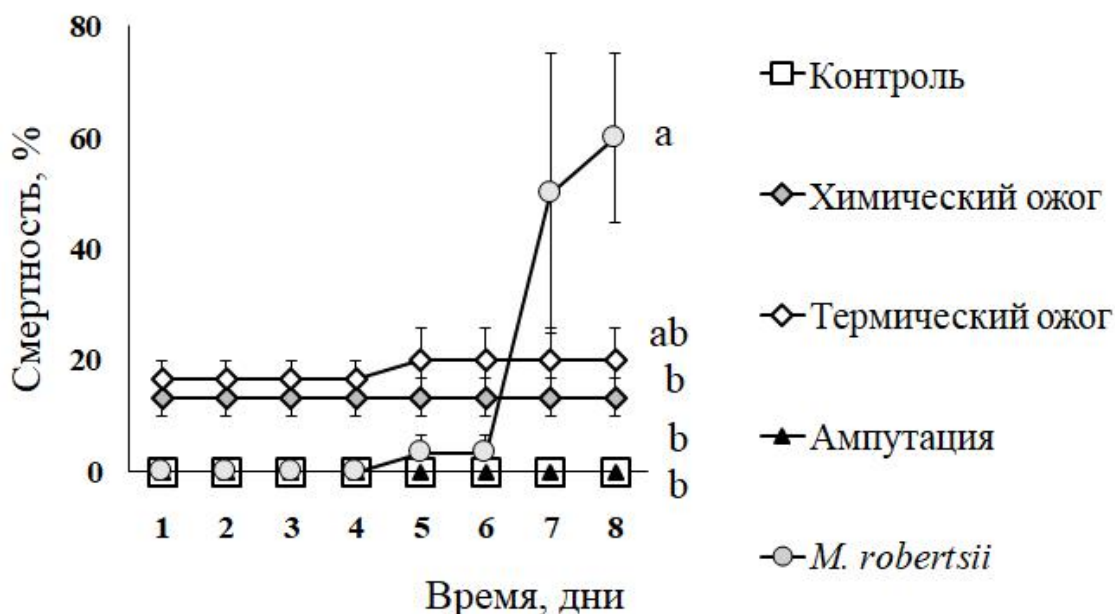


Рис. 12. Смертность личинок колорадского жука после химического (15% HCl) и термического ожогов, ампутации крайнего членика передней правой лапки (диститарсуса) и топикального нанесения конидий *M. robertsii* (5 мкл суспензии, 2×10^6 конидий на личинку). Статистически существенные различия в динамике смертности обозначены разными буквами (логранк тест, $\chi^2 = 25,69$, $df = 1$, $p < 4,01 \times 10^{-7}$).

В жировом теле также было зарегистрировано значительное увеличение экспрессии гена *LdRBLk* после термического ожога ($p < 0,001$ по сравнению с контролем). Экспрессия увеличилась до уровня пограничной значимости после ампутации (в 2,5 раза, $p = 0,06$ по сравнению с контролем). Другие виды обработки (химический ожог и грибная инфекция) не привели к изменению экспрессии *LdRBLk* в жировом теле ($p > 0,6$ по сравнению с контролем).

Зарегистрирован ряд существенных изменений в экспрессии генов транскрипционных факторов иммуносигнальных путей Toll, IMD и JAK/STAT (*DorsalDif1*, *NFkB* и *Stat*). Ген *DorsalDif1* в кутикуле и жировом теле при термическом и химическом ожоге и ампутации достоверно не изменял экспрессию. После топикальной грибной инфекции *M. robertsii* происходило слабое, но

достоверное снижение экспрессии *DorsalDif1* в 1,15 раз в кутикуле и в 1,75 раз в жировом теле (тест Данна, $p < 0,05$). Ген *NFkB* показал небольшое усиление экспрессии в ответ на термический ожог в жировом теле и слабое снижение экспрессии при развитии грибной инфекции (в 3,8 раз в кутикуле и в 1,51 раз в жировом теле, тест Данна, $p < 0,05$). Ген *Stat* не изменял экспрессии ни при одном виде стресса в кутикуле. В жировом теле при химическом ожоге отмечалась тенденция к увеличению экспрессии в 1,5 раза. При ампутации экспрессия гена *Stat* достоверно повышалась в 1,4 раза (тест Данна, $p < 0,05$ относительно контроля).

Экспрессия гена антимикробного белка аттацина (*attacin-34*) в кутикуле увеличилась в 48 раз после химического ожога и в 56 раз после термического ожога ($p < 0,003$ и $p < 0,001$ соответственно по сравнению с контролем). В случае ампутации диститарсуса экспрессия аттацина в кутикуле увеличилась несущественно (в 4 раза, $p = 0,2$ по сравнению с контролем). Инфекция *M. robertsii* не приводила к существенным изменениям экспрессии *attacin-34* в кутикуле. В жировом теле достоверное увеличение экспрессии *attacin-34* наблюдалось только после термического ожога (в 14 раз, $p < 0,002$ по сравнению с контролем). После химического ожога и ампутации увеличение было не существенным (в 4–5 раз, $p = 0,1$ по сравнению с контролем). Обработка *M. robertsii* не приводила к изменению экспрессии гена аттацина в жировом теле ($p > 0,7$). Сходные паттерны экспрессии выявлены для гена акалолептина (*aca17*). 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 ($r < 0,67$, $p > 0,22$).

Экспрессия генов белков теплового шока *hsp90* и *hsp70* в жировом теле и кутикуле достоверно не изменялась после химического и термического ожогов, а также ампутации ($p > 0,2$ по сравнению с контролем). При грибной инфекции наблюдалось снижение экспрессии *hsp90* и *hsp70* в кутикуле и/или в жировом теле в 1,3–1,4 раза ($p < 0,05$ по сравнению с контролем). Между экспрессией *LdRBLk* и *hsp90* не было обнаружено корреляции ни в жировом теле, ни в кутикуле ($r = 0,06$, $p = 0,93$ и $r = 0,29$, $p = 0,64$ соответственно).

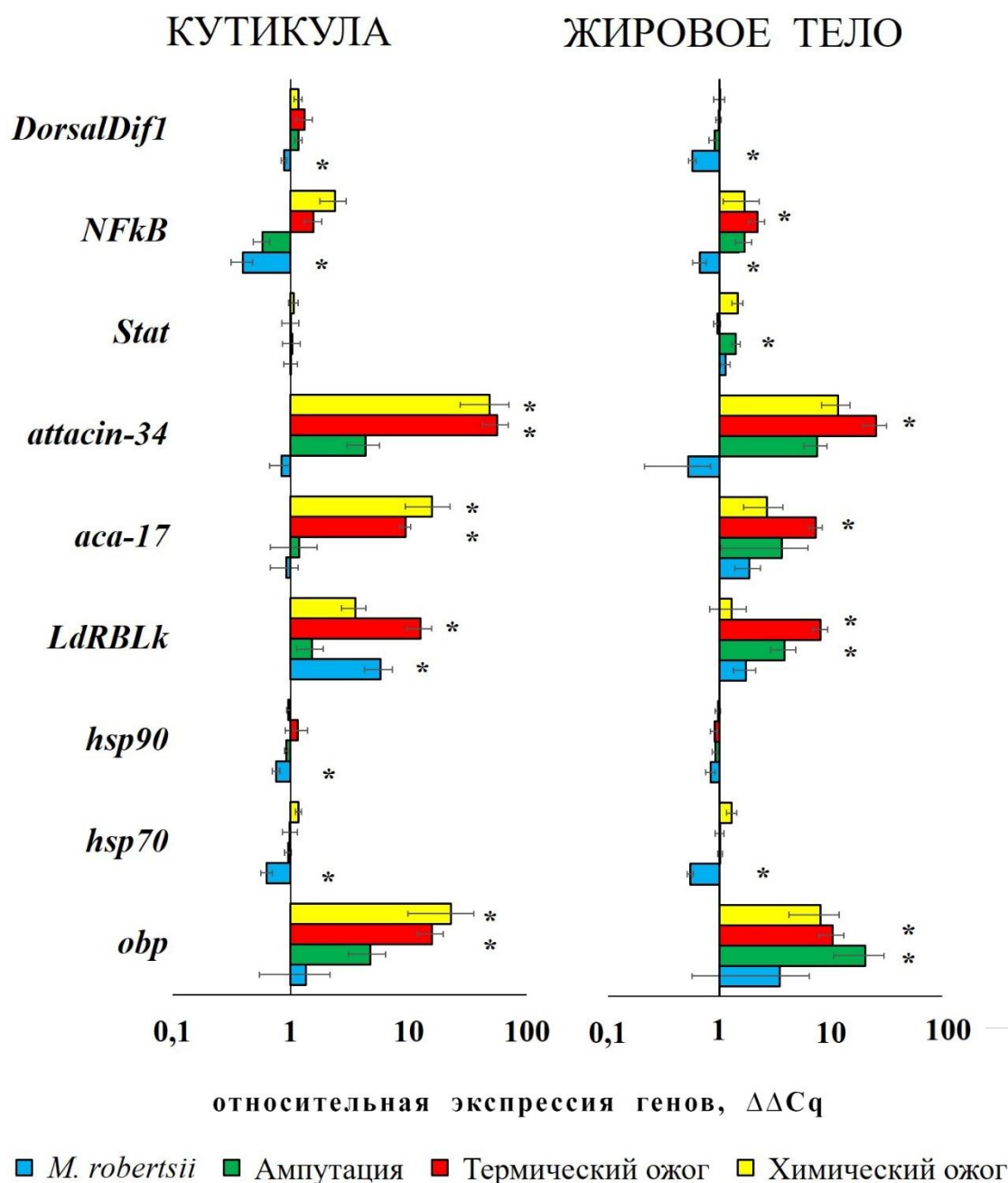


Рис. 13. Изменения экспрессии генов в тканях кутикулы и жирового тела через 24 ч после химического и термического ожогов, ампутации диститарсуса передней лапки и топиального заражения *M. robertsii* (2×10^6 конидий на личинку). Экспрессия генов нормирована на контрольный вариант и на референсные гены: рибосомальные белки 4 и 18 (*RpL4*, *RpL18*) и ген АДФ-рибозилирующего фактора-19 (*Arl19*); расчёт по методу $\Delta\Delta Cq$. * - достоверные отличия от контрольного варианта (тест Данна, $p < 0,05$).

Экспрессия гена одорант-связывающего белка (*obp*) повышалась в обеих тканях в ответ на разные повреждения. Так, в ткани кутикулы экспрессия достоверно возрастала при химическом и термическом ожогах в 23 и в 16 раз соответственно (тест Данна, $p < 0,05$). В ткани жирового тела экспрессия *obp* достоверно увеличивалась при термическом ожоге и ампутации в 10 и 20 раз соответственно (тест Данна, $p < 0,05$). При грибной инфекции уровень экспрессии *obp* существенно не изменялся.

Необходимо отметить, что экспрессия гена *LdRBLk* увеличивалась в тканях кутикулы и жирового тела через 24 ч после аналогичного топикального инфицирования *B. bassiana* (Rotskaya et al., 2021; см также Приложение. Рис. 1)

Таким образом, увеличение экспрессии гена *LdRBLk* наблюдается не только при грибной инфекции, но и в ответ на стрессы, в частности на термический ожог и ампутацию в жировом теле и кутикуле. Кроме того, после химического ожога наблюдались сходные тенденции к повышению экспрессии гена *LdRBLk*. Известно, что увеличение экспрессии эффекторных генов, в частности АМП, может возникать при различных стрессах, таких как нагревание, охлаждение или повреждение интегументов. Например, на восковой моли *G. mellonella* было показано, что кратковременное или длительное охлаждение, а также нагревание, приводят к многократному увеличению экспрессии антигрибных пептидов галлеримицина, галлиомицина и некоторых антибактериальных пептидов (Mowlds and Kavanagh, 2008; Kryukov et al., 2018). Аналогичные данные получены для американского таракана *Periplaneta americana* L. при ампутации конечностей (Liu et al., 2026). Эти изменения могут быть связаны с адаптивным ответом на стрессы, когда повышение уровня АМП может происходить и в отсутствие инфекции (Mirieri et al., 2025). Следует отметить, что в ответ на стрессы и повреждения у насекомых активируется сигнальный путь JNK, который тесно связан с путем IMD. Зависимые от JNK транскрипционные факторы FOXO могут напрямую усиливать продукцию АМП через взаимодействие с промотерами NFkB-зависимых целевых

генов (Becker et al., 2010). Нокдаун ряда генов JNK пути приводил к снижению экспрессии генов аттацинов у *Drosophila* (Kallio et al., 2005). У *dTAK1* мутантных мух и личинок *D. melanogaster* с выключенными генами *jun* и *bsk* (JNK путь) блокировалась экспрессия ряда АМП (Delaney et al., 2006).

Изменение уровня экспрессии гена *LdRBLk* в жировом теле в ответ на вышеописанные воздействия было сходно с экспрессией фактора транскрипции пути IMD – *NFkB*, а также с генами АМП *attacin-34* и *aca-17*. Эти 4 гена продемонстрировали практически единый паттерн экспрессии. При этом в эксперименте не отмечено корреляций с экспрессией транскрипционного фактора пути JAK/STAT (*Stat*). Это косвенно свидетельствует о том, что пептид LdRBLk может быть связан с путем IMD или его ветвью JNK. Полученные результаты не позволяют предположить связь экспрессии гена *LdRBLk* с путем Toll, поскольку на данной стадии мы не увидели выраженных изменений в экспрессии гена *DorsalDif1* в ответ на стрессы.

Что касается других зарегистрированных эффектов, повышение экспрессии гена *Stat* в ответ на ампутацию ожидаемо, поскольку повреждение покровов вызывает общий воспалительный процесс, в котором участвуют интерлейкин-подобные белки и АМП, экспрессия которых находится под контролем транскрипционного фактора STAT (Zhang et al., 2015).

Ген одорант-связывающего белка (*obp*) изменял свою экспрессию в кутикуле сходным образом, как и гены АМП аттацин-34 и акалолептин-17. Такая же симметрия в иммунном ответе между одорант-связывающим белком и антибактериальными пептидами описана в работе с разноцветным тополёвым листоедом (*Plagiodera versicolora* Laicharting), когда с помощью РНК-интерференции проводился нокдаун гена *obp* и наблюдалось снижение экспрессии генов рецепторов иммунного ответа PGRP и аттацина (Rong et al., 2024).

Резюмируя результаты данного раздела, отметим – экспрессия гена *LdRBLk* усиливается в ответ на различные виды стресса. При этом паттерн его экспрессии сходен с другими эффекторами иммунного ответа - аттацином и акалолептином.

3.3. Анализ структуры LdRBLk

3.3.1. Анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей

При анализе баз данных NCBI Nucleotide collection (nr/nt) и Transcriptom Shotgun Assembly (tsa) алгоритмом BLAST на наличие белков, содержащих рицин-подобный бета-трелистниковый лектиновый домен (ricin-type β -trefoil lectin domain) (pfam00652), у колорадского жука были найдены четыре таких белка (Приложение, Таблица 4). В базах Nucleotide collection (nr/nt) NCBI найдены 3 неохарактеризованных белка XM_023173982.1, XM_023173971.1, XM_023173968.1 (номера мРНК в базе NCBI). В наших исследованиях они были обозначены RBLl, RBLm, RBLn, соответственно. В базах Transcriptom shotgun assembly (tsa), под номером GEEF01084863.1 найден ещё один пептид, обозначенный нами литерой k. Этот пептид в нашей работе обозначается LdRBLk, где «Ld» – видовой префикс обозначающий принадлежность к *L. decenlineata*, «RBL» – сокращение рицин-подобный β -лектин, «k» – индекс белка в ряду паралогов рицин-подобных β -лектинов колорадского жука. Так как ген этого белка активно экспрессировался в тканях кутикулы при грибной инфекции, то был проведён его структурный и филогенетический анализ.

Полноразмерный ген LdRBLk был идентифицирован в последовательности контига GEEF01084863.1 (База данных Transcriptome Shotgun Assembly NCBI). Открытая рамка считывания (ORF) белка состоит из 381 пары оснований и кодирует 127 аминокислот (Рис. 14, Таблица 3). В отличие от других рицин-подобных β -лектинов колорадского жука, гены которых кодируются в положительной цепи ДНК, ген *LdRBLk* расположен в отрицательной цепи ДНК. Молекулярная масса белка составляет 14,033 кДа, его изоэлектрическая точка (pI) – 6,02, индекс нестабильности – 46,26, а его среднее значение индекса гидропатии (GRAVY) составляет 0,155.

1	ATG TCA GGT ATT CGG ATC ATA TCG AAA TTA TCT GGA TTA GCT TTG GAT GGA AAT GGG AGC
1	M S G I R I I S K L S G L A L D G N G S
1	
61	AAC GTC AAA GCA GCA ATG CCT AAT AAC ACC GTT GGC CAA ATT TGG TCT CTG GAA AGT TTG
21	N V K A A M P N N T V G Q I W S L E S L
12	GGA GAT GGA ACT TTT GTC ATA CAC AGT TAT TCA GAC AAG AAC ATG GTC CTA GAT ATT GAA
121	GGA GAT GGA ACT TTT GTC ATA CAC AGT TAT TCA GAC AAG AAC ATG GTA CTA GAT ATT GAA
41	G D G T F V I H S Y S D K N M V L D I E
72	TAT GGC TGC CAT GGT GAA AAT ATC ATA CTA TAT CCA AGA CAT GGT GAC GAC AAT CAA CAG
181	TAT GGC TGC CAT GGC GAA AAT ATC ATA CTA TAT CCA AGA CAT GGT GAC GAC AAT CAA CAG
61	Y G C H G E N I I L Y P R H G D D N Q Q
132	TTC
241	TTC TAC ATC AAT TCT GAC GGG ACA ATT GTA TCA GCT GGT GAC AGA CAG AAG GTT TTG CAA
81	F Y I N S D G T I V S A G D R Q K V L Q
301	ATG GTT AGA GGA AAA GTC GTG GTG CGA CCA GTG AAC ATT TCG AGG AAT GTC GAT CAC ATT
101	M V R G K V V V R P V N I S R V N D H I
361	TTC AAC ATC GAG CAA CTA TTT taa taa taa
121	F N I E Q L F * * *

Рис. 14. Аминокислотная последовательность белка LdRBLk (нижняя линия), выровненная на нуклеотидный сиквенс из базы NCBI TSA (средняя линия) и на нуклеотидный сиквенс ПЦР-продукта, полученного в исследовании экспрессии гена *LdRBLk* (верхняя линия). Подчёркнуты и обведены позиции точечных замен в последовательности гена у популяции колорадского жука из Западной Сибири, относительно последовательности, представленной в базе данных NCBI для колорадского жука из штата Висконсин, США. Обведена аминокислотная последовательность, соответствующая гидрофильному участку белка LdRBLk.

Была установлена последовательность ПЦР продукта для кПЦР (134 п.о.). При этом в сравнении с последовательностью, депонированной в базах данных NCBI GeneBank для популяции колорадского жука для региона Центральные Пески (Central Sand) штата Висконсин (Wisconsin) были идентифицированы две синонимичные точечные замены (трансверсия 168 A → C и транзиция 195 C → T). В то же время в сиквенсах ПЦР-продуктов других генов интереса или референсных генов не было обнаружено ни одной однонуклеотидной замены. При гипотетическом условии дивергенции двух популяций примерно 160 лет назад, если у *L. decemlineata* проходит два поколения за 1 год, скорость накопления

мутаций в этом локусе (134 п.н.) составляла примерно $1,55 \times 10^{-5}$ на сайт за поколение.

Таблица 3. Аминокислотный (по однобуквенному коду) и нуклеотидный сиквенс рицин-подобного β -белка LdRBLk.

Название	Длина	Сиквенс
сиквенс ORF	127aa	MSGIRIISKLSGLALDGNGSNVKAAMPNNTVGQIWS LESLGDGTFVIHSYSDKNMVLDIEYGCHGENIILYPR HGDDNQQFYINSDGTIVSAGDRQKVLQMVRGKVV VRPVNISRNV DHI FNIEQLF
сиквенс ДНК	381bp	ATGTCAGGTATTCGGATCATATCGAAATTATCTGGA TTAGCTTTGGATGGAAATGGGAGCAACGTCAAAGC AGCAATGCCTAATAACACCGTTGGCCAAATTTGGT CTCTGGAAAGTTTGGGAGATGGAAC TTTTGT CATA CACAGTTATTCAGACAAGAACATGGTACTAGATATT GAATATGGCTGCCATGGCGAAAATATCATACTATAT CCAAGACATGGTGACGACAATCAACAGTTCTACAT CAATTCTGACGGGACAATTGTATCAGCTGGTGACA GACAGAAGGTTTTGCAAATGGT TAGAGGAAAAGT CGTGGTGCGACCAGTGAACATTTTCGAGGAATGT CG ATCACATTTTCAACATCGAGCAACTATTT
сиквенс ПЦР- продукта	134bp	TGGAAAGTTTGGGAGATGGAAC TTTTGT CATA CAC AGTTATTCAGACAAGAACATGGTCCTAGATATTGA ATATGGCTGCCATGGTGAAAATATCATACTATATCC AAGACATGGTGACGACAATCAACAGTTC

По данным исследования вторичной структуры этого домена с помощью программы SOPMA, его вторичная структура составляла 11,02% альфа-спирали (alpha-helix), 40,94% вытянутой нити (extended strand), 14,96% бета-поворот (beta turn) и 33,07% произвольная спираль (random coil) (Рис. 15.А).

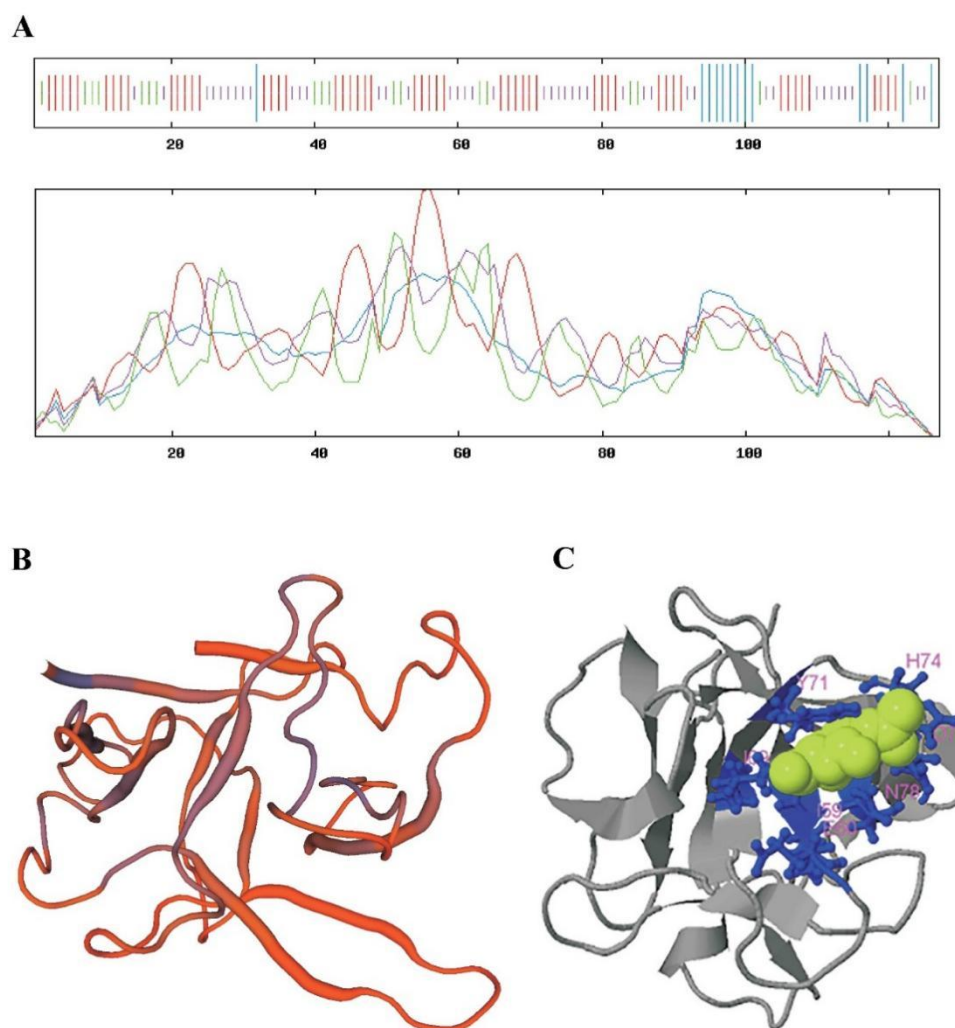


Рис. 15. (А) Предсказанная вторичная структура белка LdRBLk в онлайн-программе SOPMA. Штрихи и линии показанные синим, красным, зелёным и фиолетовым цветами, представляют альфа-спираль, вытянутую нить, бета-поворот и произвольная спираль соответственно. (В) Модель третичной структуры белка LdRBLk, построенная в SWISS-MODEL и окрашенная в соответствии с локальными показателями качества модели QMEAN, (С) Предсказанный сайт связывания лиганда (N-ацетил-D-галактозамин) для белка LdRBLk с помощью программы I-TASSER.

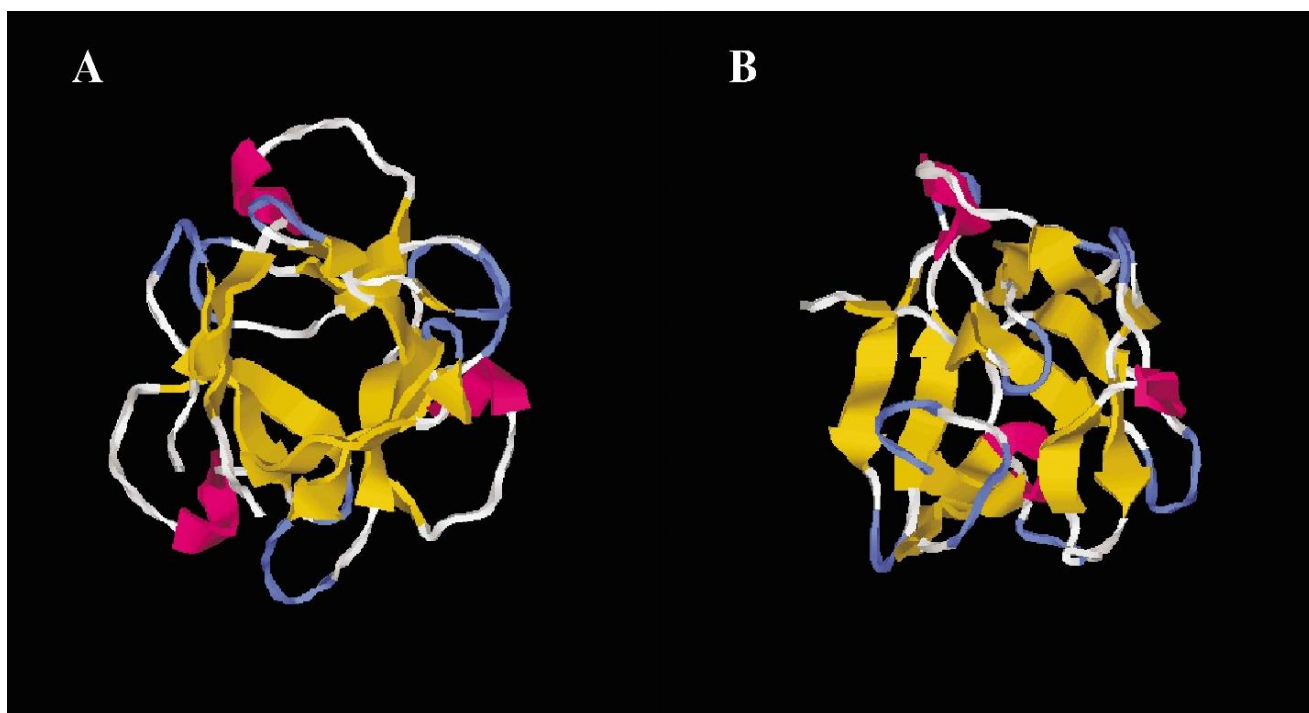


Рис. 16. Предсказанная модель третичной структуры белка LdRBLk, построенная с помощью программы I-TASSER. Модель 1 (A) и Модель 2 (B).

При построении модели третичной структуры наибольшую надёжность показала модель, в которой пептид вписывается в глобулярную структуру с N- и C-концами, расположенными рядом друг с другом. Была выбрана модель, для которой значения индексов вероятности и надёжности существования были оптимальными: GMQE = 0,49, QMEAN = -3,18 (Рис. 15.Б). Программа SWISS-MODEL также определила, что по первичной структуре пептид LdRBLk имеет наибольшее сходство третичной структуры с субкомпонентом HA1 (HA33) токсином-предшественником *Clostridium botulinum* типа C (14,53%) и с гемолитическим лектином CEL-III (22,22%).

Лидеры аналогов кристаллической структуре по базе PDB: 1,3Gal43A, экзо-бета-1,3-Галактаназа из *Clostridium thermocellum*, TM-score = 0,928. Кристаллическая структура спроектированного белка с трехкратной симметрией, ThreeFoil TM-score = 0,928.

Оценка вероятного сайта связывания лиганда с помощью программы I-TASSER (Рис. 15.С) показала, что с наибольшей вероятностью (C-score = 0,54)

целевым лигандом для LdRBLk может быть N-ацетил-D-галактозамин (NGA) с участием аминокислотных остатков в положениях 58, 59, 60, 69, 71, 74, 76 и 78 с размером кластера 126 и PDB Hit 3aj5B (Рис. 15.C).

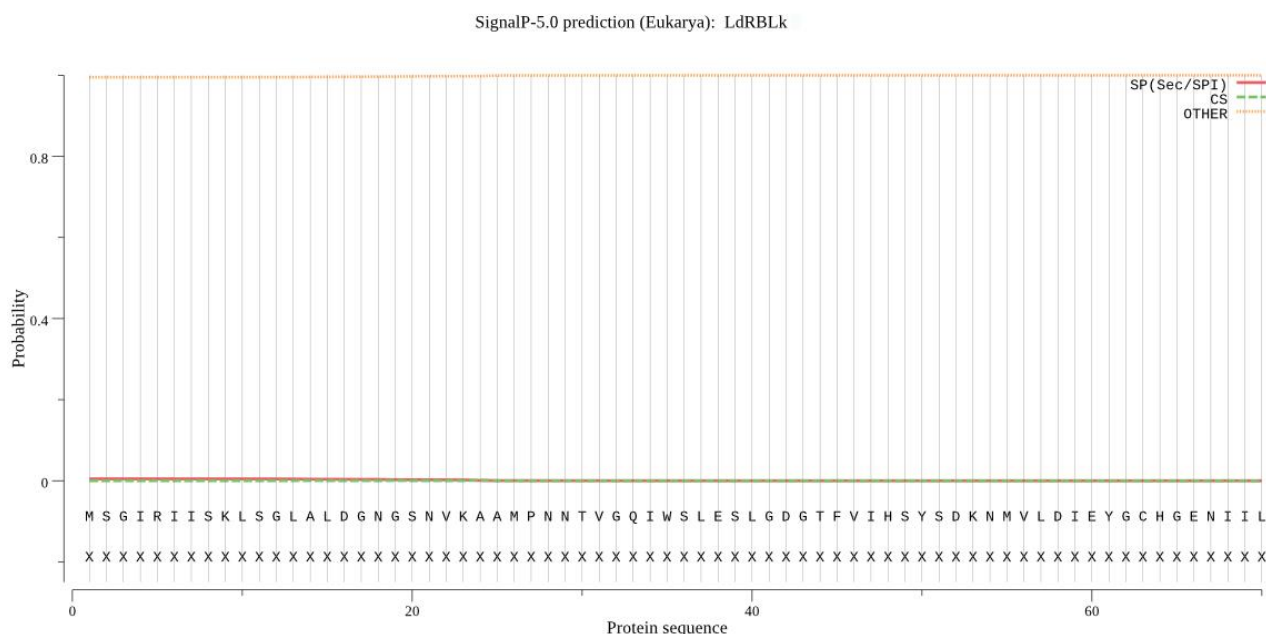


Рис. 17. Анализ возможности принадлежности белка LdRBLk к сигнальным белкам, проведённый с помощью онлайн-программы SignalP-5.0 Server.

Анализ вероятности принадлежности белка LdRBLk к сигнальным белкам в программе SignalP-5.0 показал, что: Сигнальный пептид (Sec/SPI) составил 0,48%, а «другие» (вероятность того, что данный пептид не имеет функции сигнального белка) составила 99,52% (Рис. 17). Таким образом, LdRBLk нельзя рассматривать как сигнальный белок.

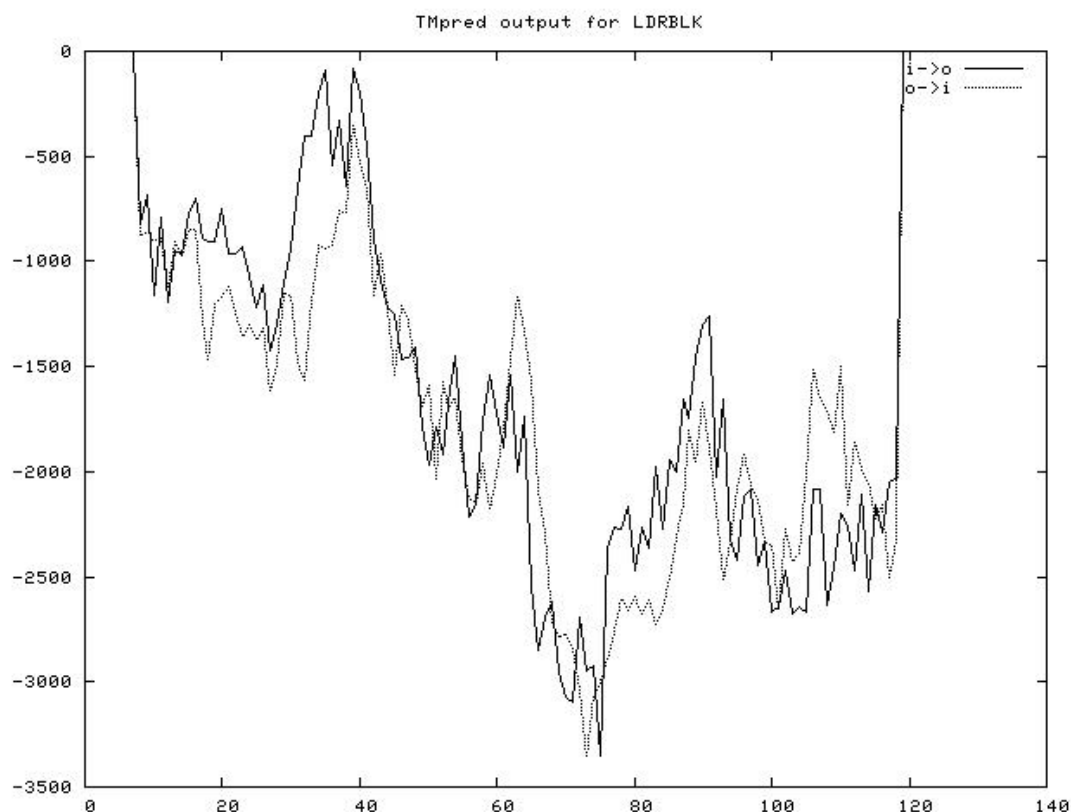


Рис. 18. Прогнозирование наличия трансмембранного домена в белке LdRBLk в онлайн-программе TMHMM. Возможные трансмембранные спирали: спирали «изнутри наружу» (i->o) найдено 0, спирали «изнутри внутрь» (o->i) найдено 0. Предлагаемые модели трансмембранной топологии: возможные модели не найдены.

Прогнозирование присутствия трансмембранного домена в белке LdRBLk в программе TMHMM показало, что TMHMM не выявил в последовательности LdRBLk предполагаемых трансмембранных альфа-спиралей (Рис. 18). Таким образом LdRBLk не является интегральным трансмембранным белком с предсказанными альфа-спиралями. Поэтому маловероятно его участие в образовании трансмембранных пор при помощи альфа-спиралей.

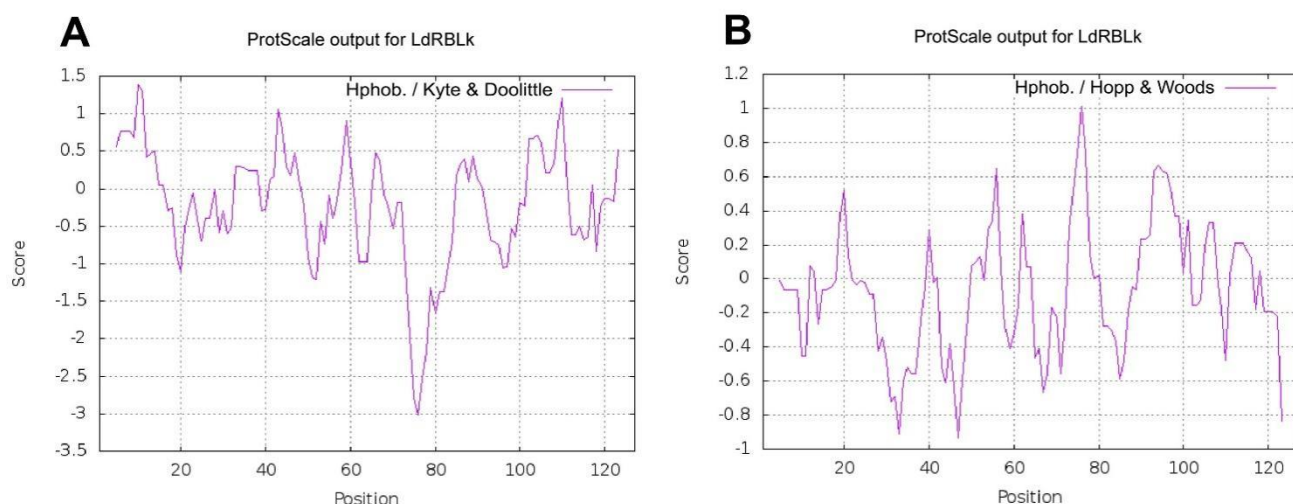


Рис. 19. Анализ гидрофильности белка LdRBLk с помощью онлайн-программы ProtScale с использованием алгоритмов Кайт-Дулиттл (А) и Хопп-Вудс (В).

Анализ гидрофильных свойств LdRBLk онлайн-программой ProtScale с использованием алгоритмов Кайта-Дулиттла (Kyte–Doolittle) и Хоппа-Вудса (Hopp–Woods) (Рис. 19) показал, что белок имеет гидрофобные N- и С-концы, при этом в области аминокислотного остатка 78 (аспарагин (N)), имелся сильный гидрофильный участок (GDDNQQF).

3.3.2. Филогенетический анализ LdRBLk

Целью данной работы было определение филогенетических связей исследуемого белка LdRBLk с другими R-лектинами колорадского жука, а также установление его связи с β -лектином токсина рицина (RBL) *R. communis*.

Было установлено, что все четыре проанализированные аминокислотные последовательности R-лектинов колорадского жука формируют монофилетическую группу с bootstrap-поддержкой 98%. При этом эта ветвь входит в монофилетическую группу для R-лектинов отряда Coleoptera с поддержкой 89%. Группы растительных белковых токсинов и растительных гликозилгидролаз организовали отдельные монофилетические группы с

поддержкой 98% и 100% соответственно. Группы R-лектинов бактерий и грибов *R. solani* образовали отдельные монофилетические группы с поддержкой 73% и 99% соответственно (Рис. 20). Внутри каждой клады R-лектины были сходны друг с другом по доменной архитектуре и структурной организации, согласно классификации для растительных лектинов, предложенной Пьюмансом и Ван Даммом (Peumans and Van Damme, 1995).

В то же время исследуемый пептид LdRBLk не группировался непосредственно с R-лектиновыми доменами растительных токсинов, включая рицин *R. communis*, а входил в кладу R-лектинов жесткокрылых. Клада лектинов растительных белков-токсинов, содержащих R-лектин *R. communis*, существенно отличалась от клады R-лектинов, входящих в семейство растительных гликозилгидролаз 5 (GH5) (Рис. 20).

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей LdRBLs (LdRBLk, XP_023029736.1, XP_023029739.1 и XP_023029750.1), полученных в программе MAFFT, показало низкую степень сходства между белками *L. decemlineata* (Рис. 21). Наибольшее различие последовательностей было на N-конце белков. При этом в области гидрофильного центра и на C-конце присутствовали идентичные аминокислоты или аминокислоты одного типа для всех четырёх последовательностей. Особенно высокой гомологией обладала область, соответствующая аминокислотным остаткам 78–79 в последовательности LdRBLk (NQQFYINSDGTI), совпадающая с гидрофильным центром. Этот результат косвенно указывает на то, что гидрофильный высокомолекулярный центр является консервативной областью белков LdRBLs. Фланговые концы белков весьма вариабельны, особенно N-конец.

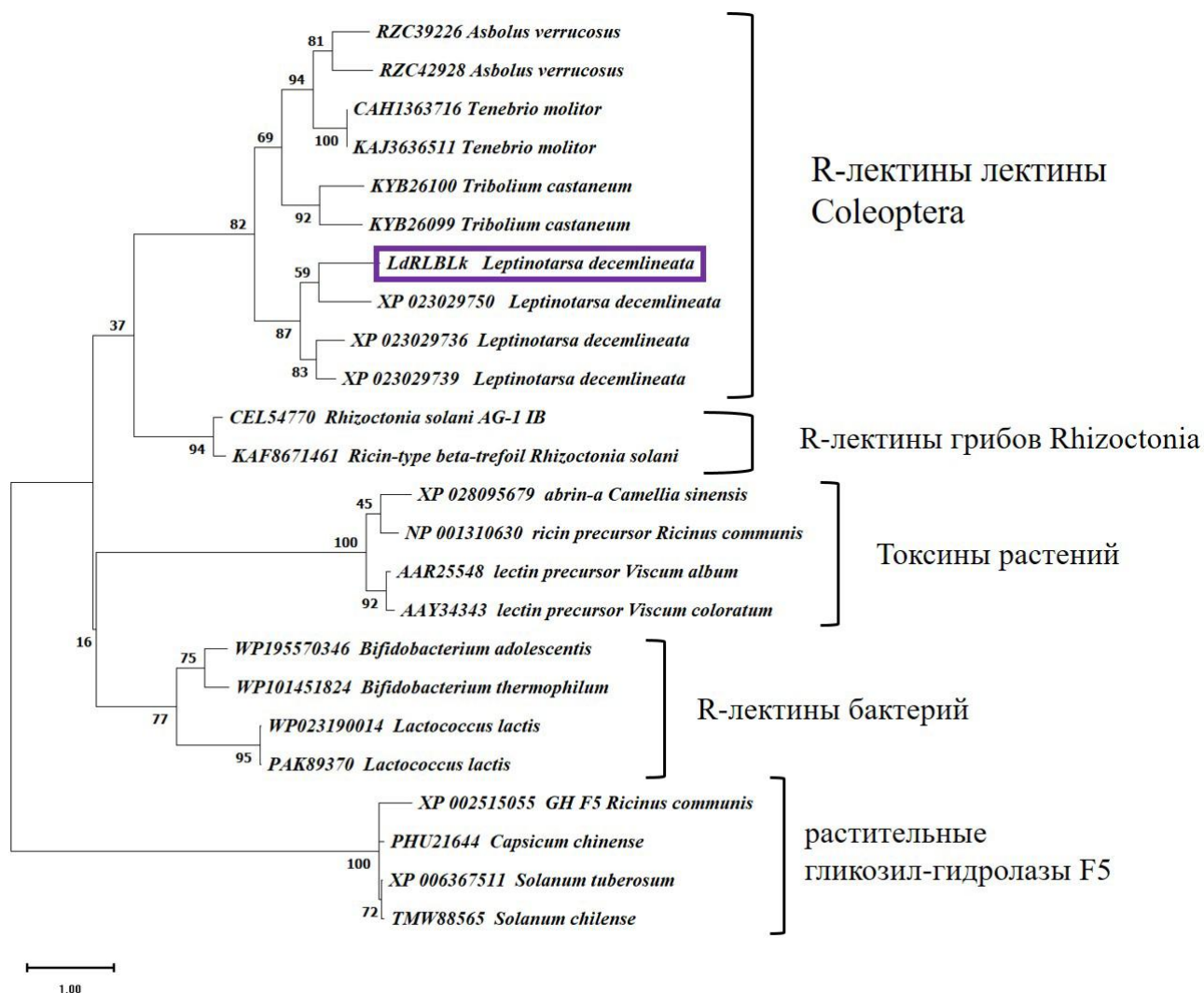


Рис. 20. Кладограмма последовательностей R-лектинов *L. decemlineata* и других жесткокрылых, семейства 5 растительных гликозилгидролаз, растительных белковых токсинов, грибов *R. solani* и бактерий, построенная по методу максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) и модели Уилана и Голдмана +F+G (Whelan and Goldman +Freq. model) (Whelan and Goldman, 2001). Показана кладограмма с максимальным значением логарифма правдоподобия (log likelihood = -9927,80). Значение bootstrap-поддержки (%) указаны рядом с соответствующими узлами. Дискретное гамма-распределение использовалось для моделирования различий в скорости эволюции между сайтами (5 категорий (+ G, параметр = 10,2324)). Дерево изображено в масштабе, при этом длины ветвей измеряются как количество замен на сайт.

CLUSTAL format alignment by MAFFT FFT-NS-i (v7.471)

```

LdRBLk      LVPS-----TFNIKMSG-----IRIISKLSGLALDGNNGSNVKAAMPNNTVGQIWSLE
XP_023029736.1 MATS-PVILFFIICISSMYCLADDYVIIQSKTSGMVLDGNHYYVRARLADGSIGQKWNLT
XP_023029739.1 MASN-SAILCFFICISSMYCLANAYIIIESKNSGLVLDGNEYNVRRAMPADGSIGQKWTLT
XP_023029750.1 MASNFSSYLFFLVVIAILTCLTEAQVRIKSKKTGLVFQYNGTNVEVAEPNDSEGQKWILE
               ....      * : ::      : * ** :*::: * *.. ..:: ** * *

LdRBLk      SLGDGTFVIHSYSDKNMVLVDIEYGCH-GE--NIILYPRHGDDNQQFFYINSDGTIVSAGDR
XP_023029736.1 STKIGRFIITN-ARNGHVLVDVQHGCKLGNTSNVIVYKNHFGGRNQEFFYINSDGTIVSSCDN
XP_023029739.1 PSDTGRFVITN-ARNGHALDVQDGCEKGN--NLIVYQKHSNLTNQLFYINSDGTIGSACNT
XP_023029750.1 CSQKGHFIINS-NKQGLAMDIDKKGCKIGQ--SVMVYDKHSRQNGQFFINSDATIGTACDA
               * *: * .   :. .: *: ** . *:   : : * . * * *: : * * * : :

LdRBLk      QKVLQMVRGKVVRPVNIS-RNVDHIFNIEQLF
XP_023029736.1 NEIIEMKDQKVEVCGKEEPCSSGDVFFKILETK
XP_023029739.1 DLIVEMKDSNGQLGDIQNSCSSGDVIFEIQAAQ
XP_023029750.1 NLILLVKDRNVEVAPRDNY-FDFDIHFEIEPIE
               : :: :   : :   :   . * * : *

```

Рис. 21. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей белков ризин-подобных β -лектинов *L. decemlineata* выполненное в онлайн-программе MAFFT (v7.471). Номера белков приведены по версии геномной аннотации 2.0 (Ldec_2_annotation). Красной рамкой обозначен высококонсервативный QxW-мотив. Синей рамкой обозначен гидрофильный участок белков xxxNQxF.

Таким образом, наши данные по теоретическому анализу структуры LdRBLk показали, что этот белок содержит только один β -трелистниковый лектиновый домен (pfam00652). Эта характеристика отличает данный белок от растительных гликозилгидролаз, где β -трелистниковый лектиновый домен рицинового типа (pfam00652) связан в один фермент с доменом гликозилгидролазы. Более того, это свойство отличает данный белок от растительных белковых токсинов, таких как ризин, абрин и их ортологи, где домен pfam00652 дублируется в одном белке и связан с доменом RIP (N-концевым рибосомно-инактивирующим доменом) (Tsaneva and Van Damme, 2020). Это означает, что все эти растительные лектины являются химеролектинами по структуре (Peumans and Van Damme, 1995). Организация белка LdRBLk также отличается от доменной архитектуры R-

лектинов бактерий и грибов, в которых домен pfam00652 обычно повторяется два или три раза (Notova et al., 2019).

Во вторичной структуре белка чередуются β -тяжи, β -повороты и неупорядоченные участки. В этом случае участки β -поворотов и неупорядоченные участки сильно варьируют и могут содержать удлиненные вставки (Рис. 14). Так же во вторичной структуре рицин-подобных β -лектинов *L. decemlineata*, был найден высококонсервативный QxW-мотив (Рис. 21).

Кроме того, во вторичной структуре белка мы обнаружили гидрофильность центра и гидрофобность его N- и C-концов (Рис. 19). Таким образом, LdRBLk неоднородное распределение гидрофильных и гидрофобных участков и может проявлять амфифильные свойства. Амфифильная структура характерна для многих антигрибных белков (Zhang et al., 2020). Эта структура помогает более эффективно связываться с поверхностью клеточных стенок грибов (De Lussa and Walsh, 1999).

Таким образом белок LdRBLk имеет структуру с β -слоями, которые могут взаимодействовать с поверхностью клеточной стенки грибов по модели «ковра» (Zhang et al., 2020). При таком взаимодействии антигрибной белок не интегрируется в клеточную стенку гриба, а образует «ковровый узор» на её поверхности. В этом случае гидрофобная сторона ковра обращена к грибной мембране, а гидрофильная сторона имеет противоположную ориентацию. В результате фосфолипидный бислой мембраны деформируется, что приводит к разрушению и лизису клеток (La Rocca et al., 1999).

Консервативный участок, включающий аспарагин 78 (GDD N QQF), совпадал с областью максимальной предсказанной гидрофильности. Согласно модели I-TASSER, остатки в этой области также могут участвовать в формировании потенциального сайта связывания углеводного лиганда. Наличие высоко варьируемых N- и C-концов в LdRBLk может также быть связано с участием белка во врожденном иммунитете колорадского жука. Механизм, посредством которого высоко варьируемые области белковых молекул участвуют в иммунном ответе, типичен для антител позвоночных (Diaz and Casali, 2002). Безусловно,

нельзя ставить знак равенства между высоко вариабельностью N- и С-концов в белке LdRBLk и антителами позвоночных: механизмы их формирования различны. Но нельзя отрицать, что в целом высокая вариабельность в ключевых участках белков иммунного ответа, может способствовать эволюционной устойчивости организма, обеспечивая гибкость при распознавании патогенов.

Анализ третичной структуры LdRBLk указывает на его сходство с субкомпонентом HA1 (HA33) предшественника токсина типа С бактерии *Clostridium botulinum* (14,53%) и с гемолитическим лектином морского беспозвоночного *Ctenactis echinata* CEL-III (22,22%) (Рис. 15 и Рис. 16). Кроме того, анализ третичной структуры показывает, что LdRBLk обладает наибольшей степенью сродства к N-ацетил-D-галактозамину. Эти данные согласуются с результатами исследований токсина *C. botulinum*, в котором субкомпонент HA1 представляет собой β -трелистниковый лектин рицинового типа, связывающийся с галактозой и N-ацетил-D-галактозамином (Nakamura et al., 2008, 2011). Гемолитический лектин CEL-III из *C. echinata* также является ортологом β -лектинов растительных токсинов абрина и рицина и проявляет сходные свойства, включая высокую гемагглютинирующую активность по отношению к эритроцитам млекопитающих (Nakano et al., 1999; Uchida et al., 2004; Hatakeyama et al., 1996).

Филогенетический анализ изученной последовательности LdRBLk относительно других рицин-подобных β -лектинов колорадского жука показал, что они являются паралогами, то есть произошли в результате дупликаций одного исходного (предкового) гена. Все четыре белка следуют схеме «один домен – один белок». Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей рицин-подобных β -лектинов насекомых отряда Coleoptera, грибов *R. solani*, бактерий, растительных гликозилгидролаз (GH) и растительных белковых токсинов, как и ожидалось, показал, что все группы образуют отдельные клады. Этот результат был подтвержден работами по растительным лектинам, содержащим лектиновый домен β -трелистниковый рицинового типа в растительном токсине рицине и его гомологах из *Abrus precatorius*, *Sambucus nigra* и *V. album* (в конфигурации RIP/ β -

лектин / β -лектин) и в растительных гликозилгидролазах (семейств GH5) (в конфигурации β -лект/GH домен) (Van Holle et al., 2017; Van Holle and Van Damme, 2019). Авторы этих работ показали, что изученные домены распределены между отдельными кладами несмотря на то, что они имеют общего эволюционного предка. Разделение этих групп на дереве также соответствует различиям их доменной архитектуры — числу лектиновых доменов R-типа и их сочетанию с другими функциональными доменами. К сожалению, в настоящее время подобные исследования состава доменов представлены только для растительных лектинов (Peumans and Van Damme, 1995; Tsaneva and Van Damme, 1995; Van Damme et al., 1998).

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

3.4.1. Влияние β -лектина рицина (RBL) из *R. communis* на прорастание конидий *M. robertsii* и *B. bassiana*

Мы исследовали влияние β -лектина токсина рицина из *R. communis* (RBL), как коммерчески доступного продукта, на прорастание грибов. Данный белок имеет сходную третичную структуру с LdRBLk и ту же лигандную специфичность (N-ацетил-D-галактозамин и галактоза) (Приложение. Рис. 2). Дозозависимое ингибирование прорастания конидий под действием RBL наблюдалось после 36 ч культивирования в среде 1/4SDAY для обоих грибов: *M. robertsii* и *B. bassiana* (эффект концентрации: $F_{4,20} = 6568,3$, $p < 0,001$) (Рис. 22). Грибы по-разному реагировали на различные дозы RBL (эффект гриба: $F_{1,20} = 2084,1$, $p < 0,001$; взаимодействие между концентрацией фактора и грибом — $F_{4,20} = 1493,0$, $p < 0,001$). Ингибирование прорастания наблюдалось при концентрации RBL 50 и 100 мкг/мл. Для *B. bassiana* при концентрации 50 мкг/мл прорастание резко снижалось до 6,2% (тест Тьюки, $p < 0,001$ по сравнению с контролем). При концентрации 100 мкг/мл проросших конидий *B. bassiana* не наблюдалось. *M. robertsii* был более устойчив к RBL. В частности, снижение прорастания до 5,1% наблюдалось только при концентрации 100 мкг/мл ($p < 0,001$).

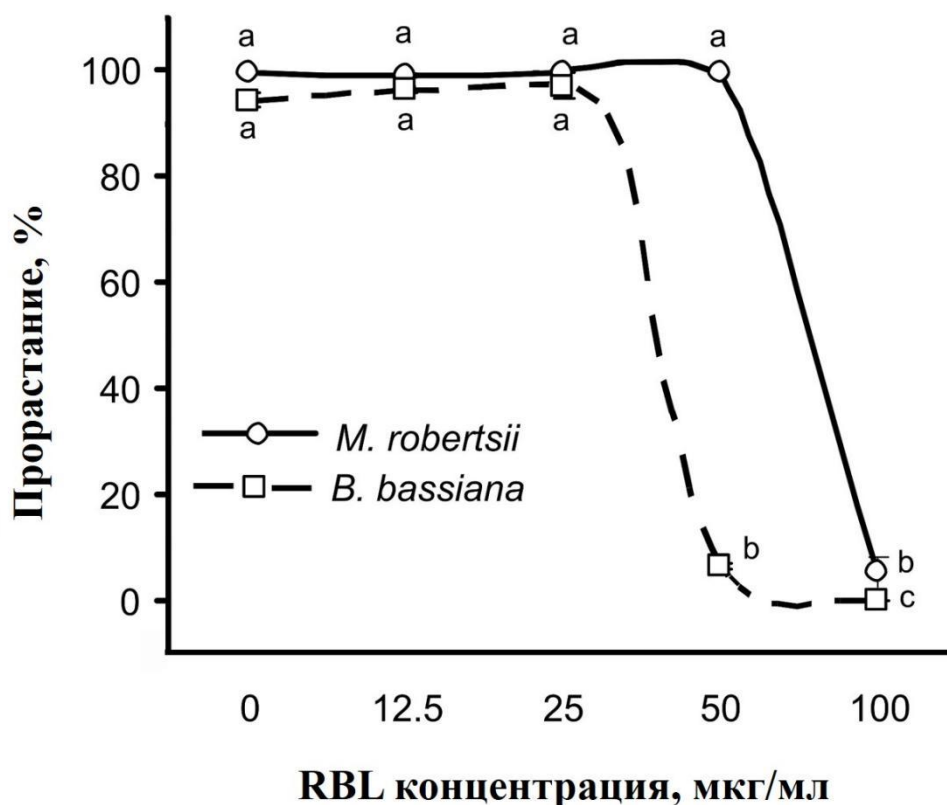


Рис. 22. Влияние RBL *R. communis* на прорастание конидий *M. robertsii* и *B. bassiana* в среде 1/4SDAY после 36 ч инкубации. Различия в буквенных обозначениях указывают на значимые различия между всеми вариантами обработки (критерий Тьюки, $p < 0,05$).

При культивировании конидий *M. robertsii* с RBL *R. communis* (75 мкг/мл) в питательной среде (1/4SDAY) в течение 24 часов развитие гриба замедлялось, формирование мицелия не происходило (Рис. 23). Визуальный осмотр и световая микроскопия показали, что в образцах, содержащих RBL, присутствовала мелкодисперсная взвесь, детектировалась визуально меньшая плотность мицелия, фрагменты мицелия и агглютинация грибных пропагул (Рис. 23С). Исходя из данных о строении белка и его лиганд-специфичности, наблюдаемая агглютинация согласуется с возможностью связывания RBL с углеводными компонентами поверхности грибных клеток.

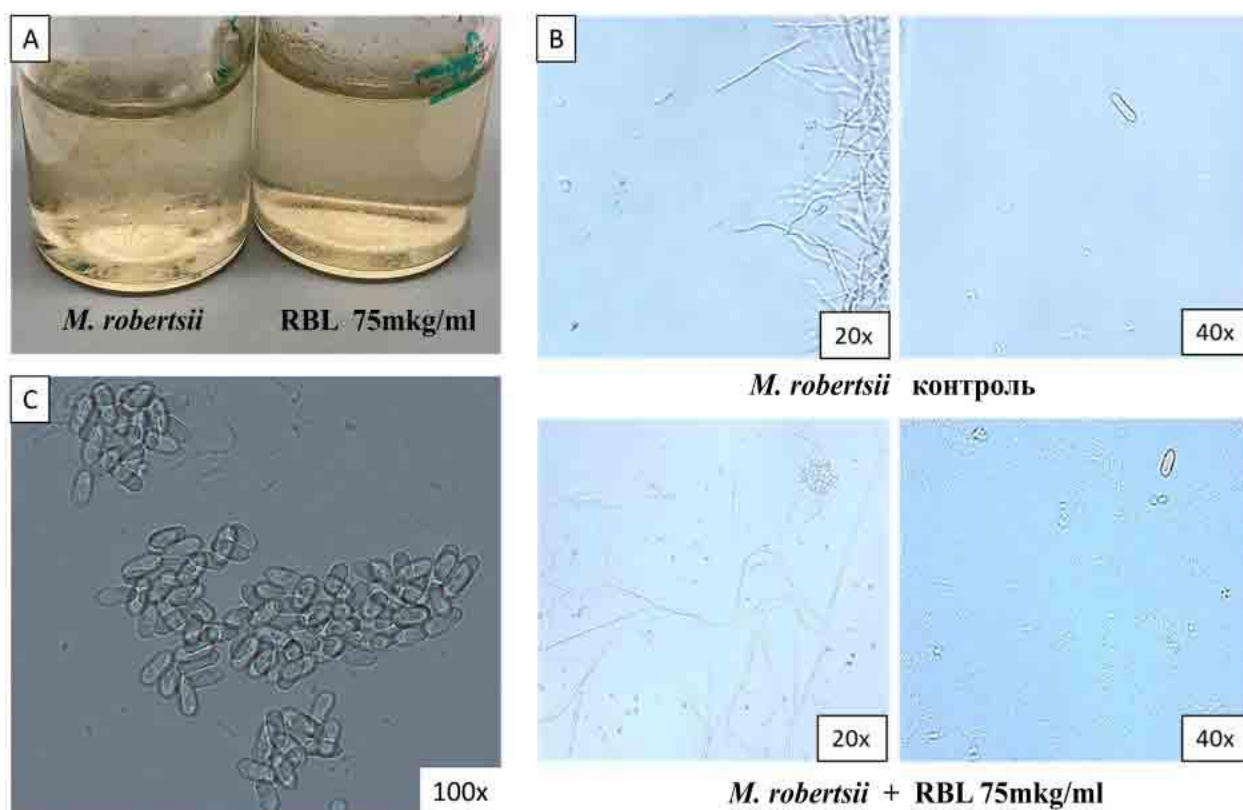


Рис. 23. Общая визуализация и световая микроскопия *M. robertsii* при культивировании с RBL *R. communis* в питательной среде (1/4SDAY) после 24 часов инкубации; (A) Форма мицелия. (B) Мутность суспензий под световым микроскопом; (C) Агглютинация бластоспор в варианте с добавлением RBL *R. communis*.

При культивировании конидий *M. robertsii* с RBL *R. communis* (75 мкг/мл) в питательной среде (1/4SDAY) в течение 4 суток инкубации формировались более крупные светлые склероции с гифальными выростами на поверхности (Рис. 24В). В контроле формировались более мелкие и более темные склероции с гладкой поверхностью (Рис. 24А). При этом количество склероциев в среде с RBL было меньше, чем в контрольной среде (1/4SDAY) без RBL (19 и 48 соответственно).

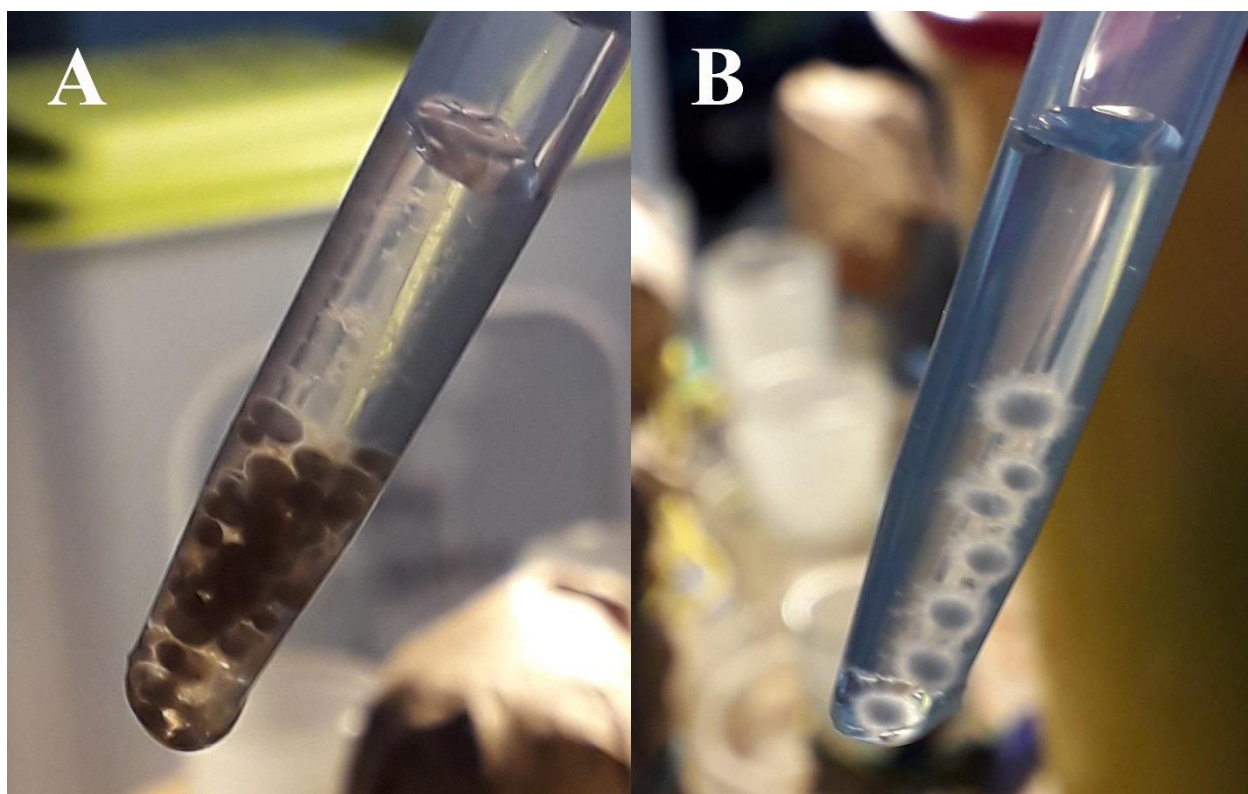


Рис. 24. Склеротии гриба *M. robertsii* сформированные на 4 сутки культивирования в среде 1/4SDAY без добавления RBL *R. communis* (А) и с добавлением RBL *R. communis* (75 мкг/мл) (В).

Бластоспоры погружённой культуры гриба *M. robertsii* культивированные в присутствии RBL *R. communis* (75 мкг/мл) в питательной среде (1/4SDAY) в течение 24 часов и контрольные образцы были проанализированы с помощью электронной трансмиссионной микроскопии (ИФПМ СО РАН, г. Томск). На снимках образцов с RBL наблюдались клеточный дебрис и фрагменты структур, морфологически соответствующие клеточной стенке (Рис. 25.А). При этом в контроле (Рис. 25.В) подобных эффектов не наблюдалось.

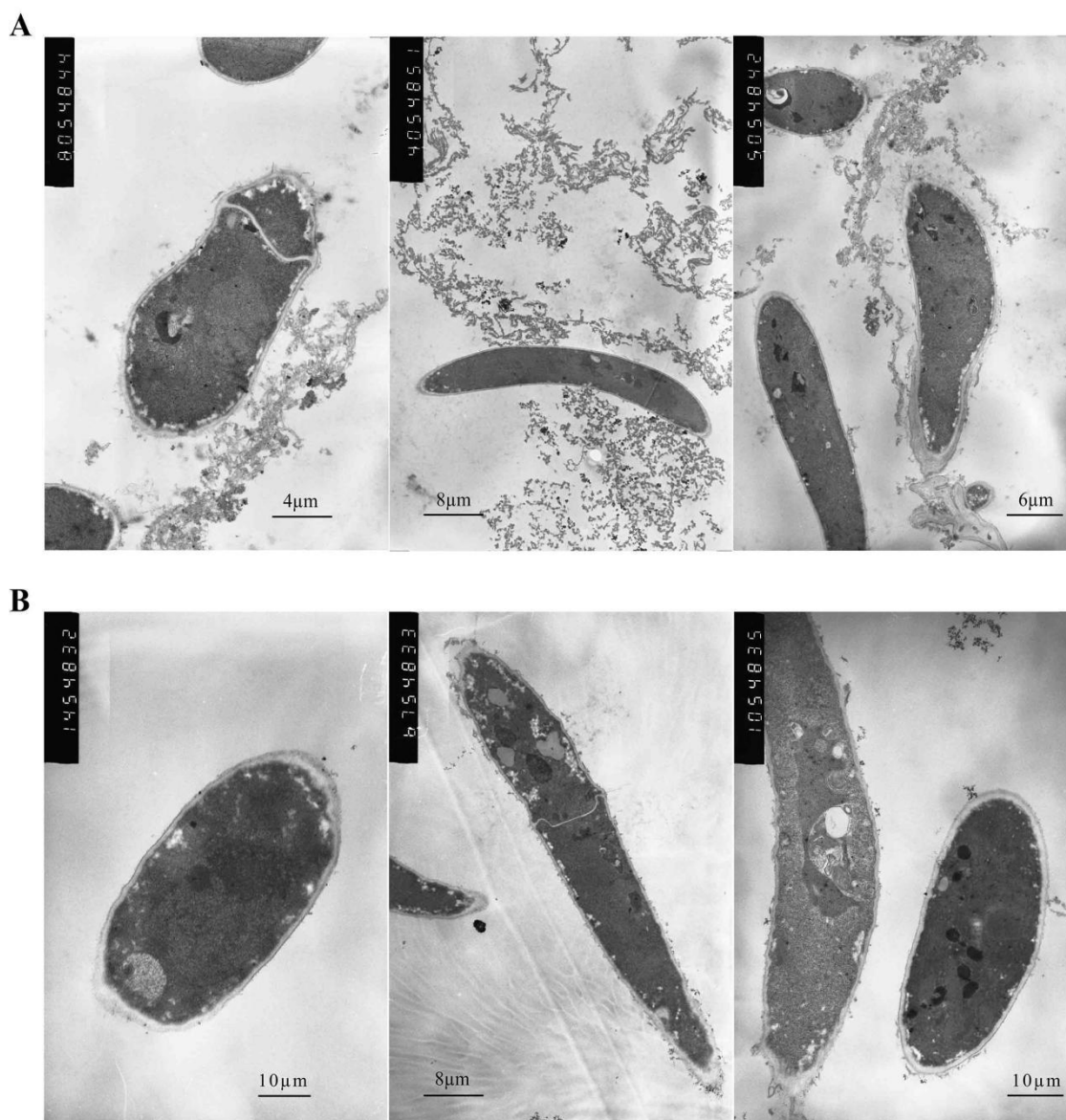


Рис. 25. Электронная микроскопия бластоспор культуры гриба *M. robertsii* в среде 1/4SDAY с добавлением RBL *R. communis* (A) и контроль (B). Масштаб указан на каждом снимке.

3.4.2. Влияние рекомбинантного R-лектина LdRBLk на прорастание конидий *M. robertsii*

Были исследованы следующие концентрации рекомбинантного лектина LdRBLk: 20 мкг/мл, 10 мкг/мл, 5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 0,1 мкг/мл. При концентрации 20 мкг/мл визуальных признаков роста грибной культуры *M. robertsii* не наблюдалось, среда оставалась прозрачной. При 10 мкг/мл и 5

мкг/мл наблюдалось частичное угнетение роста грибной культуры. При концентрациях 1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 0,1 мкг/мл не было визуального изменения плотности культуры. Прорастание конидий *M. robertsii* при концентрации рекомбинантного LdRBLk 1мкг/мл было оценено под световым микроскопом (Приложение Рис. 3).

При подсчёте длины ростовых трубок конидий было установлено достоверное различие между контрольным и экспериментальным образцом с рекомбинантным LdRBLk (1 мкг/мл). Средняя длина ростовых трубок в контроле составила 9,22 мкм, в опыте – 4,62 мкм (Т-тест, $t = 6,64$; $p = 0,00016$) (Рис. 26).



Рис. 26. Соотношение длины ростовых трубок гриба *M. robertsii* через 24 часа роста в среде 1/4SDAY и в среде 1/4SDAY с добавлением рекомбинантного лектина LdRBLk в концентрации 1 мкг/мл. * - критерий Стьюдента $t=6,6432$, $p=0,000162$.

3.4.3. Оценка структурных изменений бластоспор гриба *M. robertsii* при культивировании с рекомбинантным R-лектином LdRBLk методом атомно-силовой микроскопии

На изображениях АСМ в контрольных образцах чётко детектируется целостная структура бластоспор (Рис. 27). Также видно, что в процессе отмывки

образца водой происходит слипание бластоспор в массивы и отсутствие одиночных бластоспор (Рис. 27.А). С другой стороны, после инкубации в среде с рекомбинантным лектином LdRBLk бластоспоры не образуют массивов и среди них чётко видны: 1) целые отдельные бластоспоры, 2) бластоспоры с выходящим из клетки материалом и 3) «лопнувшие» бластоспоры без внутреннего содержимого (Рис. 27.В). Кроме того, в контрольных образцах чётко видна объёмная структура ростовых трубок (Рис. 28А). В образцах инкубированных с рекомбинантным лектином (8,3 мкг/мл) ростовые гифы имели форму «сдувшихся трубок» (Рис. 28.В).

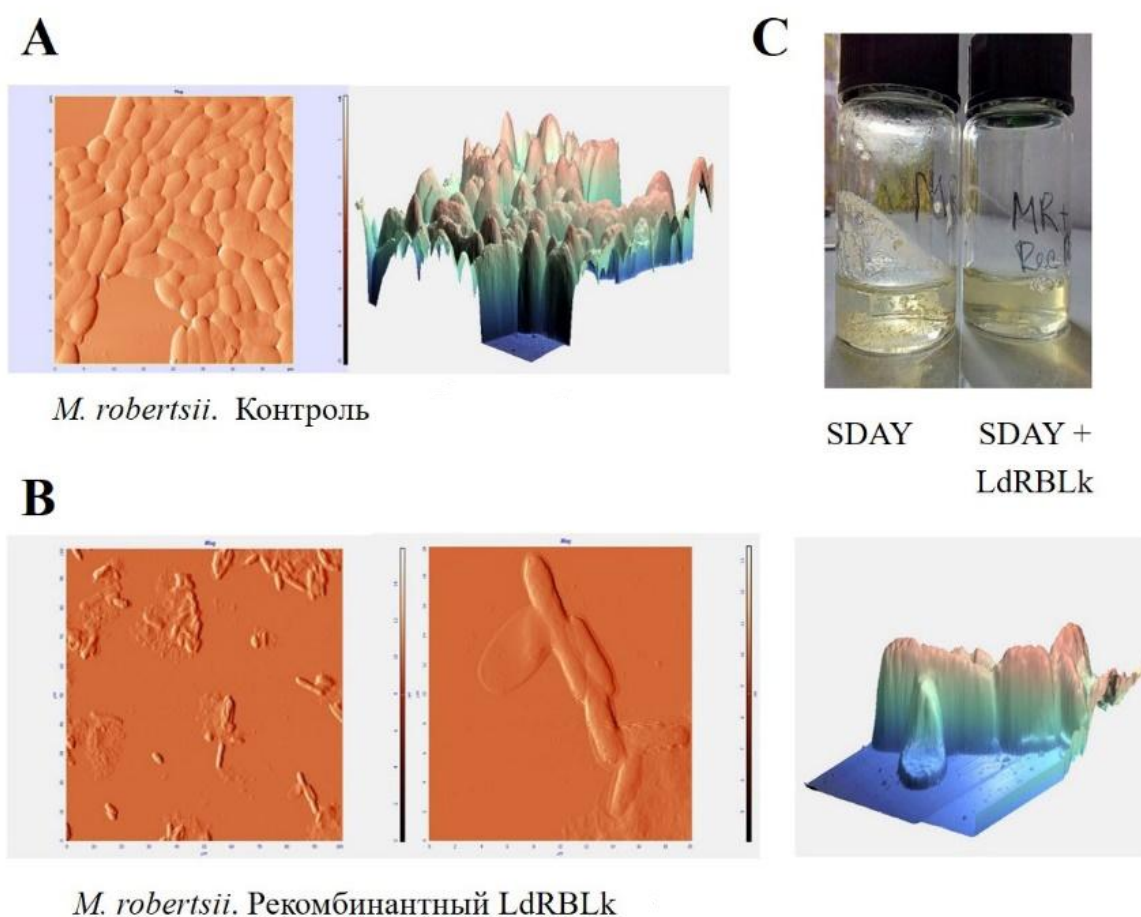
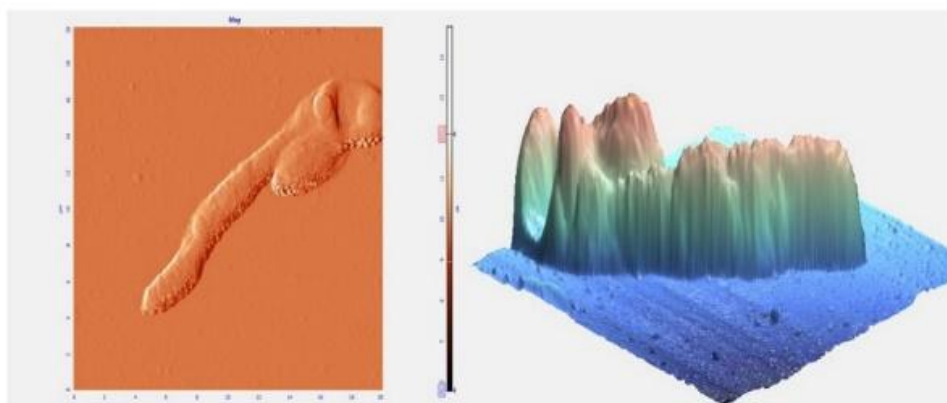


Рис. 27. **А** - Бластоспоры гриба *M. robertsii* (штамм Р-72), инкубированные в среде 1/4SDAY 12 ч. **В** - Бластоспоры гриба инкубированные на среде 1/4SDAY в присутствии рекомбинантного лектина LdRBLk (8,3мкг/мл, 12 ч.). Изображения построены в программе NT-MDT Nova RC1. **С** – Общий вид глубинной культуры гриба в 1/4SDAY и 1/4SDAY с рекомбинантным лектином LdRBLk (8,3мкг/мл).

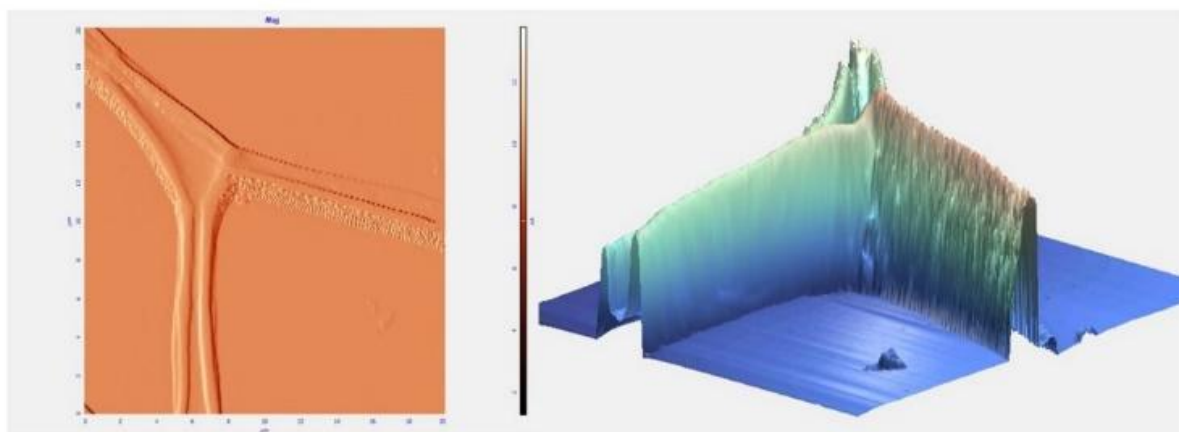
При этом в клеточных стенках блостоспор и гифов не наблюдалось визуализируемых повреждений типа «поры», хотя метод АСМ позволяет визуализировать поры, образующиеся вследствие воздействия антимикробных пептидов и белков (Stepanov et al., 2022).

А



M. robertsii. Контроль

В



M. robertsii. Рекombинантный LdRBLk

Рис. 28. **А** - Ростовые трубки гриба *M. robertsii* (штамм Р-72), инкубированные в среде 1/4SDAY 12 ч. **В** - Ростовые трубки гриба, инкубированные в среде 1/4SDAY в присутствии рекомбинантного лектина LdRBLk 8,3мкг/мл 12 ч. Изображения построены в программе NT-MDT Nova RC1.

Таким образом, в тестах *in vitro* показано, что и β -субъединица белкового токсина рицина (RBL), и рекомбинантный лектин LdRBLk обладают активностью, подавляющей рост грибного мицелия, образования ростовых трубок и влияют на формирование склероциев.

Методом электронной микроскопии было установлено, что при добавление β -лектина RBL клещевины в питательную среду наблюдались морфологические признаки повреждения и разрушения части бластоспор, включая клеточный дебрис и фрагменты клеточных оболочек, при этом оставшиеся целыми бластоспоры не несут видимых изменений клеточной стенки и внутриклеточного содержимого.

В ходе визуализации изменений бластоспор и конидиальных трубок гриба *M. robertsii* методом атомно-силовой микроскопии установлено, что в присутствии рекомбинантного лектина LdRBLk происходит разрушение клеточной стенки гриба с вытеканием клеточного содержимого. Наблюдаются «сдувшиеся» бластоспоры и конидиальные трубки, а также частицы клеточного дебриса. При этом оболочка разрушенных бластоспор не содержит повреждений типа «поры». Также, оставшиеся целыми бластоспоры не несут видимых повреждений и деформаций клеточной стенки.

Наблюдавшиеся эффекты могут быть объяснены тем, что добавленный в среду рекомбинантный LdRBLk вызывал лизис тех бластоспор, на поверхности которых образовывалось критичное накопление его молекул, достаточное для разрушения клеточной стенки. Клеточные стенки неразрушенных бластоспор также могут быть высланы некоторым количеством молекул β -лектина. Однако, при малом количестве его молекул на поверхности не происходит никакой деформации или разрушения клеточной стенки.

Полученные результаты подтверждают антигрибную активность LdRBLk и показывают, что его воздействие сопровождается выраженными морфологическими нарушениями грибных клеток. При этом отсутствие визуализируемых пор не позволяет отнести наблюдаемый эффект к классическому порообразующему механизму. Молекулярный механизм повреждающего действия

LdRBLk требует дальнейшего исследования. Необходимо подчеркнуть, что для ингибирования роста и разрушения пропагул грибов *in vitro* требуются весьма высокие концентрации рицин-подобного β -лектина, но это не исключает его роли в локальном иммунном ответе.

Исследования по взаимодействиям рицин-подобных β -лектинов с грибами единичны. Известна работа А. Ванчу с соавторами (Wanchoo et al., 2009) по связыванию R-лектина I из *R. communis* (RCA) с гифальными телами, бластоспорами и конидиями *B. bassiana*. Гифальные тела *B. bassiana*, полученные из гемолимфы *Manduca sexta* и *Heliothis virescens*, помещенные в богатую питательную среду, показали экспрессию нескольких поверхностных углеводных эпитопов и сильное связывание лектином I из *R. communis*. Способность лектинов взаимодействовать с углеводами, присутствующими на поверхности клеток микроорганизмов, подтверждается анализами агглютинации (Velayutham et al., 2016). Отметим, что ингибирование лектинов путем добавления в среды свободных углеводов или хелатирующих агентов позволяет определить целевые углеводы, участвующие в образовании связи лектинов с клеточной стенкой грибов. Например, агглютинация грибов лектинами может быть ингибирована D-маннозой (Regente et al., 2014). Выбор углевода для ингибирования агглютинирующей активности лектинов зависит от лиганд-специфичности конкретного лектина. В случае с LdRBLk наилучший теоретически рассчитанный лиганд - N-ацетил-D-галактозамин (Рис. 15.C), вторым возможным лигандом является галактоза.

Дальнейшие исследования лектина LdRBLk *in vitro* могут быть сфокусированы на изучении его углеводной специфичности, в том числе на изучении возможности галактозы и N-ацетил-D-галактозамина ингибировать антигрибную активность лектина LdRBLk. Кроме того, перспективным будет исследование спектра микроорганизмов, рост которых может подавлять лектин LdRBLk. В целом, мы впервые показали, что рициновый лектин насекомого проявляет антигрибные свойства, то есть способен участвовать в системе антигрибного иммунного ответа.

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

На данном этапе работы было необходимо оценить влияние нокдауна гена *LdRBLk* на восприимчивость колорадского жука к грибной инфекции. Кроме того, с целью выяснения возможных путей регуляции гена *LdRBLk* мы оценили влияние нокдауна транскрипционных факторов сигнальных путей Toll (гены *DorsalDif1/DorsalDif2*) и JAK/STAT (ген *Stat*) на экспрессию *LdRBLk* и выживаемость личинок при заражении грибом *B. bassiana*. Следует отметить, что на данный момент нам не удалось провести эффективный нокдаун третьего возможного пути регуляции *LdRBLk* (IMD путь) из-за сложностей по подбору дцРНК к паралогам факторов транскрипции (*NfκB*). Кроме того, попытки заблокировать данный сигнальный путь приводили к высокой гибели личинок даже при отсутствии грибной инфекции (Рощая, Крюков и др., неопубликованные данные).

3.5.1. Влияние дцРНК *Stat* на восприимчивость личинок к грибной инфекции и экспрессию генов иммунного ответа

Инъекции *dsStat* приводили к повышению смертности неинфицированных личинок по сравнению с инъекциями *dsGFP* (27% против 12% на 10 сутки) на уровне пограничной значимости ($\chi^2 = 3,8$, $p = 0,051$, Рис. 29). У инфицированных грибом личинок инъекции *dsStat* приводили к существенно более ранней и высокой смертности. 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 ($\chi^2 = 6,9$, $p = 0,009$). Общая смертность на 10 сутки составила 66% и 90% для вариантов *dsGFP+B. bassiana* и *dsStat+B. bassiana* соответственно. Эксперимент повторен независимо 2 раза и результаты были совместимыми. Личинки, погибшие после обработки *dsGFP+B. bassiana*, преимущественно (90%) мумифицировались и обрастали мицелием (Приложение Рис. 6). Уровень обрастания грибом у личинок, обработанных *dsStat+B. bassiana* был существенно ниже и составил 63% ($\chi^2 = 5,9$,

$p = 0,016$). Остальные 37% личинок имели симптомы бактериального или вирусного распада (Приложение Рис. 5), описанного нами ранее (Antonets et al., 2024).

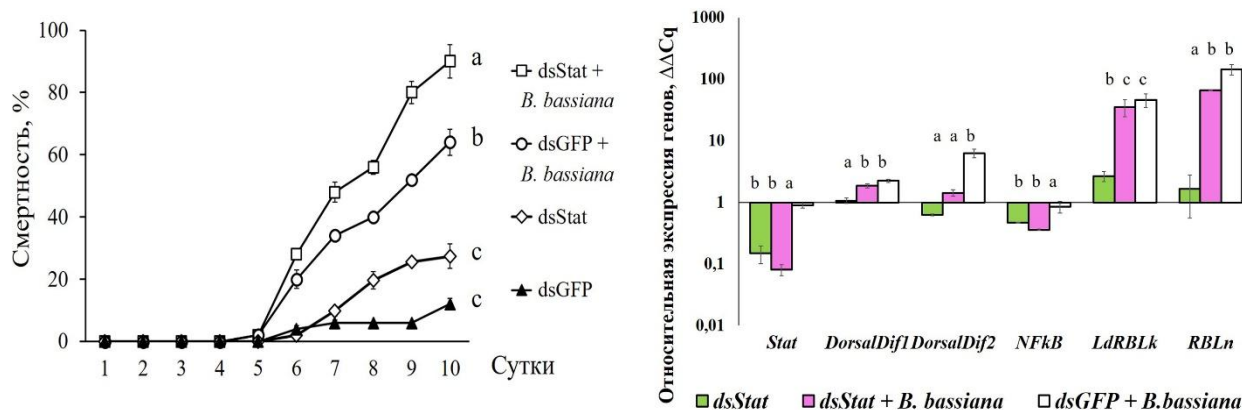


Рис. 29. Динамика смертности и экспрессия генов иммунного ответа в жировом теле личинок колорадского жука после инъекций *dsStat* и перкутанного заражения *B. bassiana*. Показаны изменения относительно экспрессии при инъекциях *dsGFP* через 72 часа после инъекций и заражения грибом. В качестве референсных использованы гены *RpL4*, *RpL18* и *Arl19*. а – отсутствие существенных различий от контроля (*dsGFP*); разные буквы показывают достоверные различия между вариантами (тест Данна, $p < 0,05$).

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 ($p < 0,0002$ и $p < 0,0008$ соответственно). Так же при инъекции *dsStat* наблюдалось подавление экспрессии гена транскрипционного фактора IMD-пути *NFkB* в 2 раза ($p = 0,049$) в варианте без грибной инфекции. Более того, оно сохранялось и при грибной инфекции: *dsGFP+B. bassiana* – в 2,1 раза при *dsStat+B. bassiana* ($p = 0,049$) (Рис. 29).

Инъекции *dsStat* не оказывали достоверного влияния на экспрессию генов транскрипционных факторов Toll-пути (*DorsalDif1* и *DorsalDif2*) в вариантах без грибной инфекции. Однако при заражении грибом *dsStat* блокировала подъем

экспрессии *DorsalDif2* (различия между вариантами *dsGFP+B. bassiana* и *dsStat+B. bassiana* в 4 раза, $p = 0,0084$).

Инъекции *dsStat* приводили к росту экспрессии гена *LdRBLk* в 2,6 раза ($p = 0,049$) в варианте без грибной инфекции. При грибной инфекции, как и ранее, регистрировался значительный подъем экспрессии *LdRBLk*, однако нокдаун *Stat* не привел к каким-либо различиям. Уровень экспрессии гена второго рибонуклеопротеинового β -лектина *RBLn* также поднимался в ответ на грибную инфекцию, но *dsStat* не оказало никакого влияния на его экспрессию.

3.5.2. Влияние дцРНК *DorsalDif1/DorsalDif2* на экспрессию генов иммунного ответа и восприимчивость к *B. bassiana*

Инъекции *dsDorsalDif1/DorsalDif2* (или *dsDorsalDif $\times$ 2*) приводили к заметному повышению смертности незараженных личинок по сравнению с инъекциями *dsGFP* (27% против 12% за 10 суток, соответственно) на уровне пограничной значимости ($\chi^2 = 3,8$, $p = 0,051$, Рис. 30). У инфицированных грибом личинок *dsDorsalDif $\times$ 2* приводил к существенно более ранней и высокой смертности. LT_{50} после обработки *dsGFP+B. bassiana* составило $8 \pm 0,6$ суток, а после обработки *dsDorsalDif $\times$ 2+B. bassiana* – $5,5 \pm 0,2$ суток ($\chi^2 = 26,2$, $p < 0,0001$). Общая выживаемость за 10 сут составила 30% и 0% для *dsGFP+B. bassiana* и *dsDorsalDif $\times$ 2+B. bassiana* соответственно. Личинки, погибшие как в варианте *dsGFP+B. bassiana*, так и в варианте *dsDorsalDif $\times$ 2+B. bassiana* мумифицировались (~90%) и обрастали мицелием (Приложение Рис. 6).

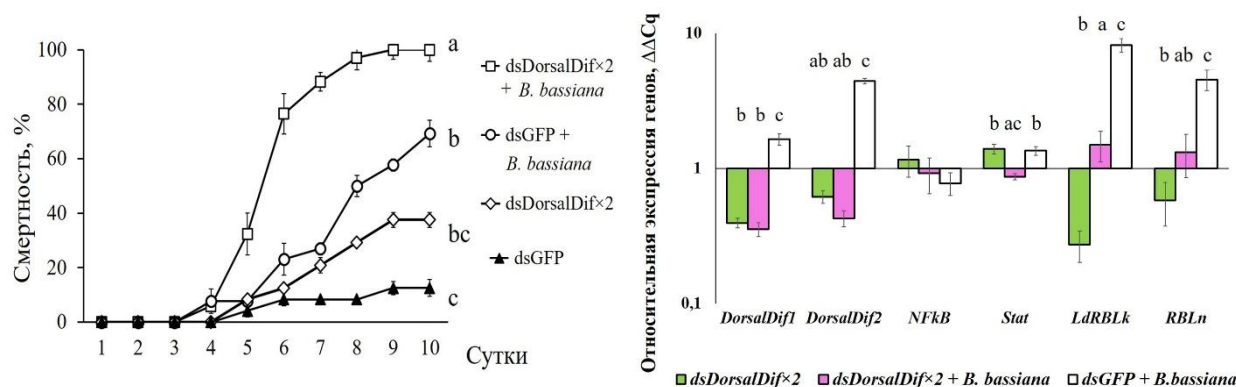


Рис. 30. Динамика смертности и экспрессия генов иммунного ответа в жировом теле личинок колорадского жука после инъекций *dsDorsalDif1/DorsalDif2* и перкутанного заражения *B. bassiana*. Показаны изменения относительно экспрессии при инъекциях *dsGFP* через 72 часа после инъекций и заражения. Референсные гены: *RpL4*, *RpL18* и *Arl19*. а – отсутствие существенных различий от контроля (*dsGFP*); разные буквы показывают достоверные различия между вариантами (тест Данна, $p < 0,05$).

Следует отметить, что при данном нокдауне зараженные грибом личинки заметно отличались внешне: в варианте *dsGFP+B. bassiana* у личинок наблюдались обширные меланистические области, характеризующие активную инкапсуляцию и меланизацию (Рис. 31А). В варианте *dsDorsalDif×2+B. bassiana* личинки имели мелкие меланистические пятна (Рис. 31В). Последнее свидетельствует об ингибировании процессов капсулообразования и меланизации при нокдауне генов транскрипционного фактора *DorsalDif*.

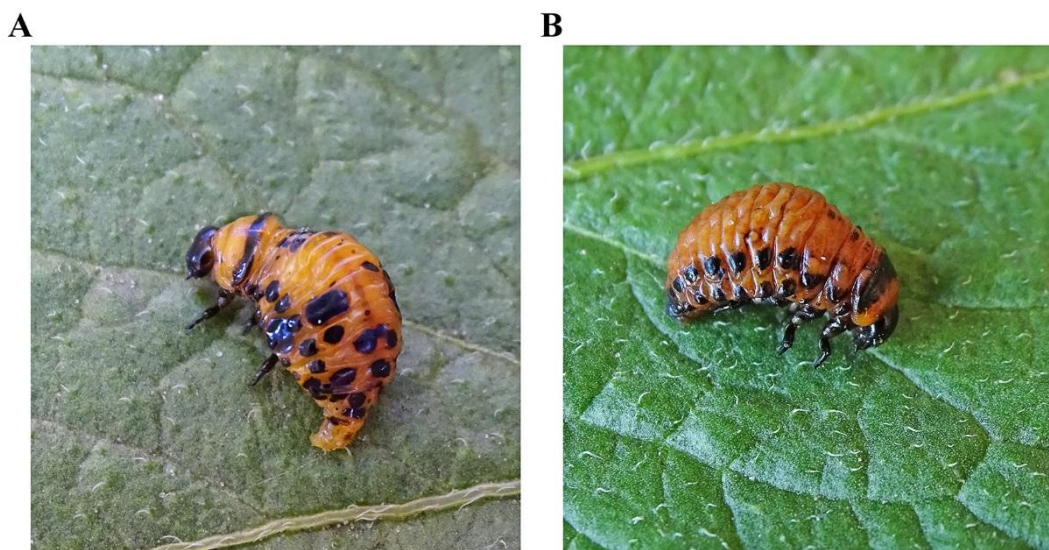


Рис. 31. Личинки *L. decenlineata* во время гибели от грибной инфекции *B. bassiana* (7-8 сутки после заражения). **А** – инъецированные *dsGFP*; **В** – инъецированные *dsDorsalDif*×2.

Инъекция *dsDorsalDif*×2 без грибной инфекции приводила к достоверному снижению экспрессии генов *DorsalDif1*, *LdRBLk* и *RBLn* в 2-3 раза ($p < 0,05$). Экспрессия гена *DorsalDif2*, снижалась в 1,6 раза, но не достоверно ($p = 0,48$). В варианте с грибной инфекцией у всех этих четырёх генов экспрессия была существенно ниже (в 5,4 – 10,2 раза) под действием *dsDorsalDif*×2+*B. bassiana* по сравнению *dsGFP*+*B. bassiana*.

Инъекция *dsDorsalDif*×2 не оказывала существенного воздействия на экспрессию транскрипционного фактора IMD-пути, гена *NFkB*, как в случае с грибной инфекцией, так и без неё. Отмечен интересный эффект инъекции *dsDorsalDif*×2 на экспрессию гена *Stat*. В отсутствие грибной инфекции *dsDorsalDif*×2 приводил к усилению экспрессии *Stat* в 1,4 раза ($p = 0,02$). При грибной инфекции *dsDorsalDif*×2 приводил к блокированию подъёма экспрессии *Stat*, то есть индукция *Stat* наблюдалась только в варианте *dsGFP*+*B. bassiana*, но не *dsDorsalDif*×2+*B. bassiana* (Рис.30).

3.5.3. Влияние *dsLdRBLk* на выживаемость и экспрессию генов иммунного ответа при грибной инфекции *B. bassiana*

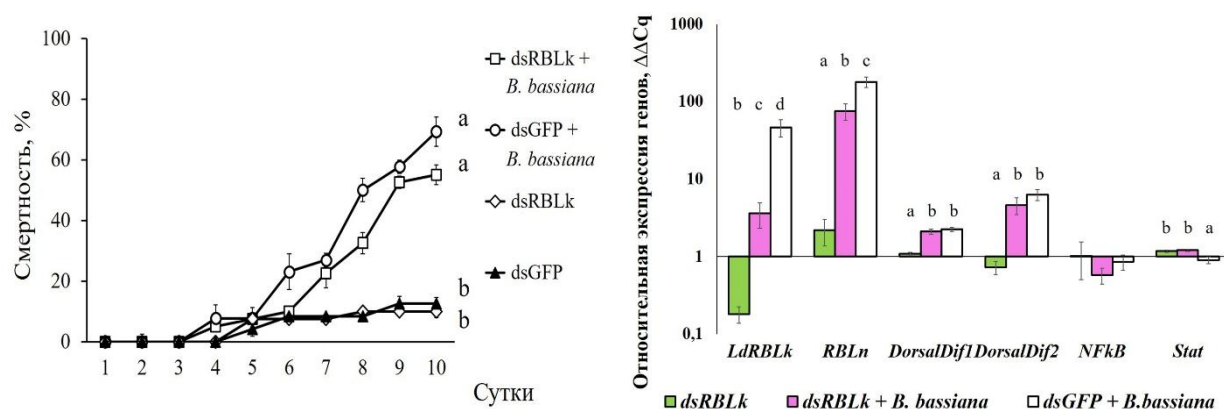


Рис. 32. Динамика смертности и экспрессия генов иммунного ответа в жировом теле личинок колорадского жука после инъекций *dsLdRBLk* и перкутанным заражением *B. bassiana* и личинок. Показаны изменения относительно экспрессий при инъекциях *dsGFP* через 72 часа после инъекций и заражения грибом. Референсные гены: *RpL4*, *RpL18* и *Arl19*. а – отсутствие существенных различий от контроля (*dsGFP*); разные буквы показывают достоверные различия между вариантами (тест Данна, $p < 0,05$).

Инъекция *dsLdRBLk* не оказывала достоверного влияния на смертность личинок *L. decemlineata*, как в вариантах с грибной инфекцией и без неё. На 10 сутки биотеста в вариантах *dsGFP* и *dsLdRBLk* смертность составила около 10% ($\chi^2 = 0,0002$, $p = 0,97$). В вариантах *dsGFP+B. bassiana* и *dsLdRBLk+B. bassiana* смертность составила 59% и 55% (Рис. 32). LT_{50} после обработки *dsGFP+B. bassiana* составило $8 \pm 0,6$ суток, а после обработки *dsLdRBLk+B. bassiana* – $9 \pm 0,4$ суток ($\chi^2 = 0,024$, $p = 0,88$).

Экспрессия гена *LdRBLk* в результате инъекции *dsLdRBLk* у незараженных грибом личинок снижалась в 4 раза ($p < 0,004$). При этом экспрессия гена-паралога *RBLn* не изменялась относительно контрольного варианта. Однако в варианте с грибной инфекцией (*dsLdRBLk+B. bassiana* в сравнении с

dsGFP+B. bassiana) отмечено существенное снижение экспрессии обоих генов *LdRBLk* и *RBLn*: в 12,9 и в 2,4 раза соответственно ($p = 0,049$ и $p = 0,046$).

Под действием *dsLdRBLk* экспрессия генов транскрипционных факторов Toll и IMD путей (*DorsalDif1*, *DorsalDif2* и *NFkB*) не изменялась как в варианте без грибной инфекции, так и у зараженных личинок. Стоит отметить, что экспрессия гена *Stat* при развитии микоза была слабо (в 1,2 раза), но существенно выше у насекомых инъецированных *dsLdRBLk* по сравнению с таковыми, инъецированными *dsGFP* ($p = 0,049$) (Рис. 32).

По результатам раздела можно сделать следующие основные заключения. Нам удалось провести эффективный нокдаун гена *Stat*, комплекса *DorsalDif1/DorsalDif2*, а также целевого эффекторного гена *LdRBLk*. Нокдаун *Stat* и *DorsalDif*×2 отразился на экспрессии других генов иммунного ответа, свидетельствующих о возможной кроссрегуляции этих путей. Кроме того, блокирование *Stat* и особенно *DorsalDif*×2 привели к значительному повышению уровня смертности при развитии грибной инфекции. Нокдаун непосредственно *LdRBLk* приводил к минимальным изменениям в экспрессии других генов и не показал существенных изменений в восприимчивости насекомых к *B. bassiana*. Полученные данные свидетельствуют о том, что регуляция гена *LdRBLk* связана с путем Toll и слабо связана (или не связана) с путем JAK/STAT. Ниже обсудим полученные эффекты более подробно.

При инъекциях *dsStat*, даже без грибной инфекции наблюдалось повышение смертности относительно контроля ($P = 0,051$). Это соотносится с эффектом нокдауна гена *Stat* у *Tribolium castaneum*. Согласно генетическим базам данных для этого вида (iBeetle-Base. <https://ibeetle-base.uni-goettingen.de/>) нокдаун гена *Stat* приводит к 70% гибели личинок и 30% гибели куколок. При грибной инфекции, нокдаун *Stat* приводил не только к более ранней смертности личинок колорадского жука, но и к изменениям в симптоматике патогенеза. В случае с *dsGFP+B. bassiana* около 90% трупов обрастали мицелием, соответственно развивался классический микоз со стандартным иммунным ответом, который сдерживает развитие симбиотных микроорганизмов жука (Kryukov et al., 2025).

В варианте *dsStat+B. bassiana* уровень обрастания мицелием был ниже, а 37% личинок имели симптомы бактериального или вирусного распада (Antonets et al., 2024; Приложение Рис. 5). Это говорит о том, что блокировка гена *Stat* меняла схему ответа так, что грибная инфекция получала меньше преимуществ в личинках, уступая бактериальным и вирусным инфекциям. В работе, выполненной на тутовом шелкопряде *Bombix mori* было показано, что усиление экспрессии генов *Stat* приводило к увеличению выживаемости при инфекциях *Staphylococcus aureus* и *B. bassiana*, в то время как их нокдаун существенно снижал выживаемость при указанных патогенезах (Zhou et al., 2024), что хорошо согласуется с нашими результатами.

Анализ экспрессии генов показал, что инъекция *dsStat* успешно снижала экспрессию *Stat* не только в случае самостоятельного воздействия, но и при грибной инфекции. Факт удачно проведённой РНК-интерференции гена *Stat* подтверждает, что на *L. decemlineata* эта методика успешно выполняема. При РНК-интерференции *Stat* нами было установлено снижение экспрессии генов *DorsalDif2* и *NFkB* при грибной инфекции. Это указывает на корреляцию между всеми тремя иммуносигнальными путями, хотя подобные кросс-регуляции в основном описаны между Toll и IMD путями (Alejandro et al., 2022; Tanji et al., 2007). Наблюдаемый небольшой подъем экспрессии *LdRBLk* у незараженных личинок при нокдауне *Stat* возможно связан с компенсаторными функциями иммунитета и требует дальнейшего изучения. Отсутствие изменений в экспрессии гена *LdRBLk* под действием *дцStat* у зараженных грибом личинок свидетельствует в пользу слабой зависимости регуляции *LdRBLk* от пути JAK/STAT.

При инъекциях *dsDorsalDif×2* нами также отмечено повышение смертности неинфицированных грибом личинок до 37% на уровне маргинальной значимости. Данный эффект соотносится с нокдауном этих генов у *T. castaneum*, приводящим к 40-100% гибели личинок (iBeetle-Base. <https://ibeetle-base.uni-goettingen.de/>). Нокдаун генов *DorsalDif×2* существенно повышал восприимчивость колорадского жука к грибной инфекции, что хорошо согласуется с работами по отключению компонентов пути Toll у разных таксонов насекомых (Mansoori et al., 2016;

Bingsohn et al., 2017). Toll путь – главный путь антигрибного ответа и при блокировании экспрессии генов его транскрипционных факторов (*DorsalDif1* и *DorsalDif2*) грибная инфекция развивается значительно быстрее. Нокдаун *DorsalDif*×2 приводил к снижению экспрессии эффекторов *LdRBLk* и *RBLn* как у незараженных, так и у зараженных грибом личинок. Это свидетельствует в пользу Toll-зависимой регуляции генов рицин-подобных β-лектинов.

Важно отметить, что нокдаун *DorsalDif*×2 приводил к изменениям симптомов микоза: отсутствию обширных облаков инкапсуляции/ меланизации под кутикулой по сравнению с вариантом *dsGFP+B. bassiana*. Это позволяет предположить, что транскрипционный фактор *DorsalDif* у колорадского жука участвует не только в экспрессии АМП, но и в формировании локального клеточно-меланизационного очага при грибной инфекции. Ускоренная гибель личинок после нокдауна генов *DorsalDif1/DorsalDif2* в сочетании с отсутствием крупных подкутикулярных меланистических инкапсуляционных очагов указывает на нарушение гемоцит опосредованной инкапсуляции и меланизации. В работах на *Drosophila* (Qiu et al., 1998) показано, что гены Toll-пути влияют на гемоцитарный ответ. Снижение активности генов Toll-пути уменьшает концентрацию гемоцитов и способность к инкапсуляции; так потеря белка *Cactus* (негативного регулятора *DorsalDif*), приводит к повышению плотности гемоцитов. Кроме того, Toll-активация и ФО-каскад включаются через общие механизмы, связанные с активацией сериновых протеаз (Zdybicka-Barabas et al., 2025). При нокдауне гена 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 в ответ на вторжение гифальных тел гриба. Снижение экспрессии гена *LdRBLk* в этих условиях позволяет рассматривать лектин как опсонизирующий фактор, необходимый для эффективного связывания грибных структур гемоцитами и последующей меланизации. Таким образом, отсутствие крупных меланистических очагов у личинок с нокдауном генов *dsDorsalDif*×2 можно объяснить срывом работы единой *DorsalDif* – зависимой системы, включающей активацию

гемоцитов, экспрессию гена *LdRBLk* и запуск локальной клеточно меланизационной защиты против *B. bassiana*.

Другая возможная причина менее выраженной меланизации может быть связана с изменением концентрации вторичных метаболитов гриба в *dsDorsalDif*×2 личинках. Грибы *B. bassiana* вырабатывают ряд соединений, (например, ооспорин) ингибирующих расщепление профенолоксидазы до активной формы (Feng et al., 2015). Поэтому более быстрое развитие микопатогена у личинок с нокадауном генов *DorsalDif*×2 может приводить к раннему и устойчивому подавлению фенолоксидазного каскада. Следует также отметить, что нокадаун генов *DorsalDif*×2 приводил к блокированию экспрессии *Stat* в ответ на грибную инфекцию. Блокирование гена *Stat* может вносить вклад в снижение уровня инкапсуляции, поскольку путь JAK/STAT контролирует ряд процессов клеточного иммунитета (Morin-Poulard et al., 2013; Bang 2019). Для определения того, какой из перечисленных механизмов является определяющим в подавлении меланизационных и инкапсуляционных процессов при ингибировании экспрессии генов *DorsalDif*, требуется дополнительный комплекс исследований.

Мы не регистрировали изменений в выживаемости личинок после нокадауна *LdRBLk*, в том числе у инфицированных грибом насекомых. Этот результат показывает, что лектин *LdRBLk* является лишь одним из эффекторов антигрибного иммунного ответа. Отсутствие эффекта от нокадауна *LdRBLk* может объясняться как наличием его паралога, так и тем, что в антигрибном ответе колорадского жука принимает участие большое количество эффекторов, потенциально способных компенсировать друг друга. На данный момент известны паралоги *LdRBLk*: *RBLn* (XP_023029736.1), *RBLl* (XP_023029750.1) и *RBLm* (XP_023029739.1) (Приложение, Таблица 4). Кроме того, нами было показано, что грибные инфекции у колорадского жука приводят к подъёму экспрессии более чем 40 эффекторных генов, в том числе антигрибных белков тенецина-3, холотрицина-3, тауматина, лектинов С-типа, генов связанных с ФО-каскадом и продукцией активированных форм кислорода и азота (арилсульфатазы, лакказы, синтазы оксида азота), генов, связанных с восстановлением кутикулы (хитинсинтазы,

хитиндеацетилазы), антиоксидантными процессами и ряда других (Kryukov et al., 2026). Учитывая такой спектр эффекторов вполне логично, что нокдаун только одного гена *LdRBLk* не привёл к видимым изменениям выживаемости или видимых особенностей патогенеза.

Резюмируя вышеизложенное, отметим, что нокдаун гена *LdRBLk* не приводит к изменению восприимчивости колорадского жука к грибной инфекции. Однако нокдаун генов факторов транскрипции *DorsalDif*, приводит к ингибированию обоих паралогов рициновых β -лектинов (*LdRBLk* и *RBLn*) и более быстрой гибели личинок после заражения грибом. Кроме того, нокдаун *DorsalDif*, по всей видимости, меняет ответ со стороны клеточного иммунитета и фенолоксидазной системы. Поэтому последующие исследования могут быть сфокусированы на понимании влияния поздних (нижележащих) компонентов каскада Toll-пути на механизмы регуляции фенолоксидазного каскада, молекулярные взаимодействия с генами рицин-подобных лектинов, а также их влияния на процессы инкапсуляции у колорадского жука. Отдельного внимания заслуживает анализ кросс-регуляций между путями Toll и JAK/STAT. С прикладной точки зрения, результаты по нокдауну генов *DorsalDif* могут быть перспективными для разработки комбинированных препаратов, сочетающих пропагулы 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 колорадского жука изучался в контексте конституциональной защиты, связанной с морфологическими и биохимическими свойствами кутикулы (Tomilova et al., 2019), параметрами клеточного иммунитета, а также с активностью фенолоксидаз, антиоксидантных и детоксицирующих ферментов (Tunaz et al., 2008; Kryukov et al., 2014; Tomilova et al., 2016, 2019; Yaroslavtseva et al., 2017). 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 – рицин-подобным β -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 рицин-подобных β -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 для гемоцитов наиболее характерна индуцибельная экспрессия генов эффекторов иммунного ответа (ниже порога детекции через 24 часа и максимальная индукция через 72 часа), что соотносится с предыдущими исследованиями (Kaya et al., 2025; Ding et al., 2020; Vaibhvi et al., 2022) и подтверждается нашими транскриптомными исследованиями на личинках колорадского жука (Kryukov et al., 2026). При этом мы впервые показали, что гены рицин-подобных β -лектинов *LdRBLk* и *RBLn* значительно повышают экспрессию в тканях кутикулы, жирового тела и гемоцитах в ответ на заражение разными

видами грибов. Это свидетельствует в пользу их участия в антигрибном иммунном ответе колорадского жука.

В последующих экспериментах показано, что гены *LdRBLk* и *RBLn* повышают экспрессию не только в ответ на грибные инфекции, но и на стрессы, 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, вероятно, связана с активацией сигнального пути JNK/MAPK (Kallio et al., 2005; Delaney et al., 2006). Поэтому дальнейшие исследования могут быть направлены на изучение влияния JNK/MAPK на экспрессию эффекторов иммунного ответа (в частности *LdRBLk* и *RBLn*) у колорадского жука.

Проведенный биоинформатический анализ показал, что рицин-подобные β -лектины колорадского жука содержат один и тот же белковый домен и являются паралогами, произошедшими от общего белкового предка путём удвоения гена. Путём филогенетического анализа было установлено, что рицин-подобные β -лектины колорадского жука наиболее близки к таковым *Tribolium castaneum* (Coleoptera) и являются ортологами β -лектинов, гликозилгидролаз и токсинов организмов из царств 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 белок 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 рицина из *R. communis* (RBL) и рекомбинантным лектином *LdRBLk*. Было обнаружено, что добавление RBL к культурам энтомопатогенного гриба *M. robertsii* и *B. bassiana* снижает прорастание конидий, вплоть до полного ингибирования их роста. При

добавлении рицин-подобных β -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 рицин-подобных β -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* (Рис. 33) и не зависит от экспрессии гена транскрипционного фактора JAK/STAT пути (*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 *LdRBLk* не вызывал снижения выживаемости личинок или изменений в чувствительности к грибной инфекции. Последнее может быть связано с компенсаторными эффектами, связанными с изменением экспрессии паралога *LdRBLk* или других эффекторов пути Toll. Интересным и важным эффектом было снижение уровня меланизации в ответ на грибную инфекцию у личинок с нокдауном *DorsalDif1/DorsalDif2*. 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 рицин-подобных β -лектинов пока остается открытым. Будущие исследования могут быть сосредоточены на более глубоком понимании регуляторных механизмов, исследуемых лектинов в системе иммуносигнальных путей, фенолоксидазного каскада и клеточного иммунитета жесткокрылых насекомых.

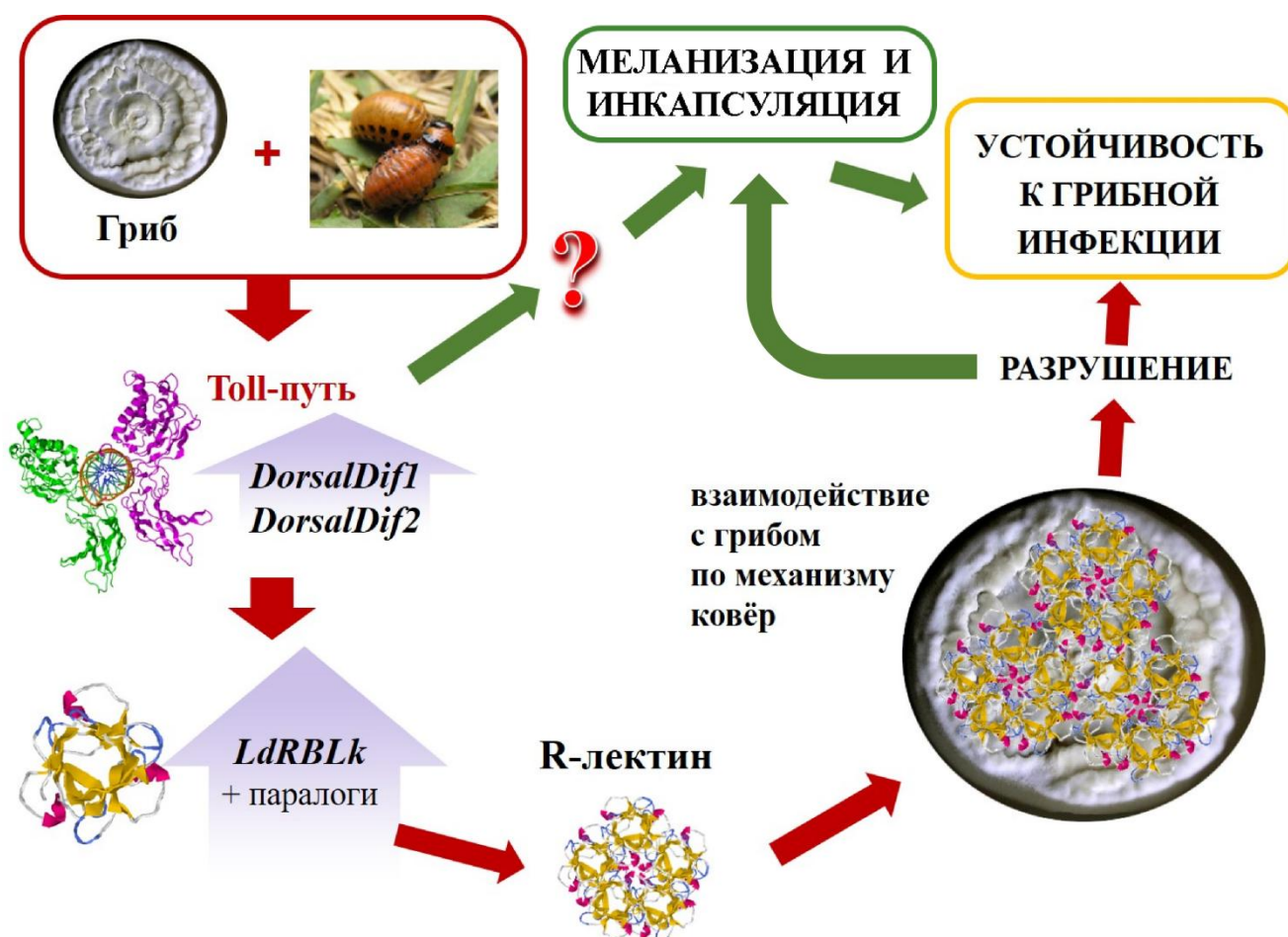


Рис. 33. Обобщённая схема работы R-лектинов в антигрибном иммунном ответе колорадского жука на примере лектина LdRBLk.

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

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

Работы, опубликованные в рецензируемых изданиях:

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.

Работы, опубликованные в сборниках материалов конференций:

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

Рощая, 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. Глунов // 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.Н. Косман, М.В. Тюрин, В.В. Глунов // 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 иммуносигнальных 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКМ	– активные кислородные метаболиты
АМП	– антимикробные пептиды и белки
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
дцДНК	– двухцепочечная ДНК
дцРНК	– двухцепочечная РНК
кДНК	– комплементарная ДНК
кПЦР	– количественная полимеразная цепная реакция
проФО	– профенолоксидазы
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РФА	– реактивные формы азота
ФО	– фенолоксидазы
CRD	– углевод-распознающи домен
DAMP	– молекулярные паттерны ассоциированные с повреждениями
GNBP	– рецептор связывающий грамотрицательные бактерии
HSP	– белки теплового шока
LdRBLk	– рицин-подобный β -лектин колорадского жука, паралог k
LdRBLn	– рицин-подобный β -лектин колорадского жука, паралог n
OBP	– одорант-связывающие белки
PAMP	– патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
PGRP	– пептидогликан -распознающие белки
RBL	– рицин-подобный β -лектин
RdRp	– РНК-зависимая РНК-полимераза
β GRP	– β -1,3-глюкан-распознающие белки

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Паралоги – гомологичные белки, принадлежащие одному организму. Они возникают в результате дупликации исходного предкового гена и могут разойтись в процессе эволюции настолько, что начнут выполнять разные функции.

Ортологи – гомологичные белки из разных организмов, разошедшиеся в процессе видообразования от единой предковой формы и выполняющие чаще всего одну и ту же функцию.

Бластоспоры [греч. *blast(os)* – росток, зародыш и *spora* – сев, семя] –

– (*in vivo*) одноклеточные гифальные тела, который образуют гифы энтомопатогенного гриба, успешно проросшие через кутикулу и достигшие гемоцеля. Это криптическая форма роста, считается, что эта уникальная структура помогает бластоспорам избежать обнаружения иммунной системой хозяина. Бластоспоры размножаются почкованием и используют циркулирующую гемолимфу в качестве «носителя» для колонизации хозяина, а также источника питания (Valero-Jiménez et al., 2016).

– (*in vitro*) формы спор образующиеся при погружённой ферментации, в отличие от ферментации на твёрдом субстрате. Размножение бластоспорами происходит подобно дрожжам, но не является истинным почкованием дрожжей. Большинство или все виды энтомопатогенных грибов *Beauveria*, *Metarhizium* и *Cordyceps* будут расти в виде бластоспор при соответствующих условиях жидкой ферментации (Jaronski, 2023).

ЛИТЕРАТУРА

1. Abdukerim, R. Potential of *Beauveria* species isolated from southern Kazakhstan for controlling Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) populations under arid conditions / R. Abdukerim, M. Mussina, G. Abysheva [et al.] // *Insects*. 2025. Vol. 16. № 2. – P. 176.
2. Abendroth, J.A. Pleiotropic function of antenna-specific odorant-binding protein links xenobiotic adaptation and olfaction in *Leptinotarsa decemlineata* / J.A. Abendroth, T.W. Moural, C. Cruse [et al.] // *Insects*. 2025. Vol. 16. № 12. – P. 1259.
3. Agrawal, N. RNA interference: biology, mechanism, and applications / N. Agrawal, P.V. Dasaradhi, A. Mohammed, P. Malhotra, R.K. Bhatnagar, S.K. Mukherjee // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003. Vol. 67. № 4. – P. 657–685.
4. Ahmed, T.A. Recent insights into structure–function relationships of antimicrobial peptides / T.A. Ahmed, R. Hammami // *Journal of Food Biochemistry*. 2019. Vol. 43. – P. e12546.
5. Alberts, B. The Shape and Structure of Proteins / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis [et al.] – Текст: электронный // In: *Molecular Biology of the Cell*. – 4th ed. – New York: Garland Science, 2002. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26830/> (дата обращения: 20.04.2026)
6. Alejandro, A.D. The IMD and Toll canonical immune pathways of *Triatoma pallidipennis* are preferentially activated by Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively, but cross-activation also occurs / A.D. Alejandro, L.J.P. Lilia, J.M.B. Jesús, H.R.M. Henry // *Parasites and Vectors*. 2022. Vol. 15. № 1. – P. 256.
7. Almagro-Armenteros, J.J. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks / J.J. Almagro-Armenteros, K.D. Tsirigos, C.K. Sønderby [et al.] // *Nature Biotechnology*. 2019. Vol. 37. № 4. – P. 420–423.
8. Andra, J. Cecropins, antibacterial peptides from insects and mammals, are potently fungicidal against *Candida albicans* / J. Andra, O. Berninghausen, M. Leippe // *Medicin Microbiology and Immunology*. 2001. Vol. 189. № 3. – P. 169–173.

9. 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.
10. Audi, J. Ricin poisoning: a comprehensive review / J. Audi, M. Belson, M. Patel, J. Schier, J. Osterloh // JAMA. 2005. Vol. 294. № 18. – P. 2342–2351.
11. Ayaz, S. Host immunity mechanisms against bacterial and viral infections in *Bombyx mori* / S. Ayaz, W.W. Kong, J. Wang, S.H. Liu, J.P. Xu // Insects. 2025. Vol. 16. № 11. – P. 1167.
12. Balandin, S.V. Antimicrobial peptides of invertebrates. Part 1. Structure, biosynthesis, and evolution / S.V. Balandin, T.V. Ovchinnikova // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2016. Vol. 42. № 3. – P. 229–248.
13. Banfi, D. The role of heat shock proteins in insect stress response, immunity, and climate adaptation / D. Banfi, T. Bianchi, M. Mastore, M.F. Brivio // Insects. 2025. Vol. 16. № 7. – P. 741.
14. Bang, I.S. JAK/STAT signaling in insect innate immunity / I.S. Bang // Entomol Res. 2019. Vol. 49. № 5. – P. 339–353.
15. Becker, T. FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis / T. Becker, G. Loch, M. Beyer [et al.] // Nature. 2010. Vol. 463. № 7279. – P. 369–373.
16. Bingsohn, L. Knockdown of genes in the Toll pathway reveals new lethal RNA interference targets for insect pest control / L. Bingsohn, E. Knorr, A. Billion, K.E. Narva, A. Vilcinskas // Insect Mol Biol. 2017. Vol. 26. № 1. – P. 92–102.
17. Bouafoura, R. Characterization of insecticide response-associated transcripts in the Colorado potato beetle: relevance of selected cytochrome P450s and clothianidin / R. Bouafoura, P. Bastarache, B.C. Ouédraogo, P. Dumas, C.E. Moffat, J.L. Vickruck, P.J. Morin // Insects. 2022. Vol. 13. № 6. – P. 505.
18. Bowman, S.M. The structure and synthesis of the fungal cell wall / S.M. Bowman, S.J. Free // Bioessays. 2006. Vol. 28. № 8. – P. 799–808.
19. Bradberry, S.M. Ricin poisoning / S.M. Bradberry, K.J. Dickens, P. Rice, G.D. Griffiths, J.A. Vale // Toxicological Reviews. 2003. Vol. 22. № 1. – P. 65–70.

20. Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? / K.A. Brogden // *Nature Reviews Microbiology*. 2005. Vol. 3. № 4. – P. 238–250.
21. Bucher, G. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) / G. Bucher, J. Scholten, M. Klingler // *Current Biology*. 2002. Vol. 12. № 3. – P. R85–R86.
22. Bulet, P. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation / P. Bulet, R. Stocklin // *Protein Pept Lett*. 2005. Vol. 12. № 1. – P. 3–11.
23. Cabib, E. How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall / E. Cabib, J. Arroyo // *Nature Reviews Microbiology*. 2013. Vol. 11. № 9. – P. 648–655.
24. Cao, X. *Drosophila melanogaster* as a model to study polymicrobial synergy and dysbiosis / X. Cao, J. Scofield, B. Xie, D.B. Morton, H. Wu // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2023. Vol. 13. – P. 1279380.
25. Cao, X. The immune signaling pathways of *Manduca sexta* / X. Cao, Y. He, Y. Hu [et al.] // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2015. Vol. 62. – P. 64–74.
26. Cao, Y. TGF- β 1 mediates 70-kDa heat shock protein induction due to ultraviolet irradiation in human skin fibroblasts / Y. Cao, N. Ohwatari, T. Matsumoto, M. Kosaka, A. Ohtsuru, S. Yamashita // *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. 1999. Vol. 438. № 3. – P. 239–244.
27. Cerenius, L. The proPo-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity / L. Cerenius, B.L. Lee, K. Söderhäll // *Trends of Immunology*. 2008. Vol. 29. – P. 263–271.
28. Chaitanya, R.K. Oxidative stress in invertebrate systems / R.K. Chaitanya, K. Shashank, P. Sridevi // In: *Free Radicals and Diseases* / ed. by R. Ahmad. – London: InTechOpen, 2016. – P. 119–128
29. Chalfie, M. Green fluorescent protein as a marker for gene expression / M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, D.C. Prasher // *Science*. 1994. Vol. 263. № 5148. – P. 802–805.
30. Chen, E.H. Visualizing the membrane disruption action of antimicrobial peptides by cryo-electron tomography / E.H. Chen, C.H. Wang, Y.T. Liao [et al.] // *Natural Community*. 2023. Vol. 14. № 1. – P. 5464.

- 31.Chen, R. Pattern recognition receptors: function, regulation and therapeutic potential / R. Chen, J. Zou, J. Chen, X. Zhong, R. Kang, D. Tang // Signal Transduction and Target Therapy. 2025. Vol. 10. № 1. – P. 216.
- 32.Chen, Y.H. Rapid evolution of insecticide resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* / Y.H. Chen, Z.P. Cohen, E.M. Bueno, B.M. Christensen, S.D. Schoville // Current Opinion in Insect Science. 2023. Vol. 55. – P. 101000.
- 33.Cherry, S. Host-pathogen interactions in *Drosophila*: new tricks from an old friend / S. Cherry, N. Silverman // Nat Immunol. 2006. Vol. 7. № 10. – P. 1159-1165.
- 34.Chouvenc, T. Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* / T. Chouvenc, N.Y. Su, A. Robert // Journal of Invertebrate Pathology. 2009. Vol. 101. № 3. – P. 234–241.
- 35.Clements, J. Characterizing molecular mechanisms of imidacloprid resistance in select populations of *Leptinotarsa decemlineata* in the central sands region of Wisconsin / J. Clements, S. Schoville, N. Peterson, Q. Lan, R.L. Groves // PLoS One. 2016. Vol. 11. № 1. – P. e0147844.
- 36.Clements, J. RNA interference of three up-regulated transcripts associated with insecticide resistance in an imidacloprid resistant population of *Leptinotarsa decemlineata* / J. Clements, S. Schoville, N. Peterson, A.S. Huseth, Q. Lan, R.L. Groves // Pesticide Biochemistry and Physiology. 2017. Vol. 135. – P. 35–40.
- 37.Clements, J. Targeted RNA sequencing reveals differential patterns of transcript expression in geographically discrete, insecticide resistant populations of *Leptinotarsa decemlineata* / J. Clements, K. Lamour, K. Frost, J. Dwyer, A. Huseth, R.L. Groves // Pest Management Science. 2021. Vol. 77. № 7. – P. 3436–3444.
- 38.Clements, J. Transcriptomic analysis reveals similarities in genetic activation of detoxification mechanisms resulting from imidacloprid and chlorothalonil exposure / J. Clements, B. Sanchez-Sedillo, C.A. Bradfield, R.L. Groves // PLoS One. 2018. Vol. 13. № 10. – P. e0205881.
- 39.Cummings, R.D. R-Type Lectins / R.D. Cummings, R.L. Schnaar, Y. Ozeki // In: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko [et al.] eds. Essentials of Glycobiology. – 4th ed. –

- Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022. – P. [chapter 31].
40. De Lucca, A.J. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens / A.J. De Lucca, T.J. Walsh // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999. Vol. 43. № 1. – P. 1–11.
 41. Delaney, J.R. Cooperative control of *Drosophila* immune responses by the JNK and NF- κ B signaling pathways / J.R. Delaney, S. Stöven, H. Uvell, K.V. Anderson, Y. Engström, M. Mlodzik // *EMBO Journal*. 2006. Vol. 25. № 13. – P. 3068–3077.
 42. Diaz, M. Somatic immunoglobulin hypermutation / M. Diaz, P. Casali // *Current Opinion in Immunology*. 2002. Vol. 14. № 2. – P. 235–240.
 43. DiGabriele, A. Structure of a heparin-linked biologically active dimer of fibroblast growth factor / A. DiGabriele, I. Lax, D. Chen [et al.] // *Nature*. 1998. Vol. 393. № 6687. – P. 812–817.
 44. Ding, J.L. Transcriptomic analyses reveal comprehensive responses of insect hemocytes to mycopathogen *Beauveria bassiana*, and fungal virulence-related cell wall protein assists pathogen to evade host cellular defense / J.L. Ding, J. Hou, M.G. Feng, S.H. Ying // *Virulence*. 2020. Vol. 11. № 1. – P. 1352–1365.
 45. Dolezal, T. How to eliminate pathogen without killing oneself? Immunometabolism of encapsulation and melanization in *Drosophila* / T. Dolezal // *Frontiers in Immunology*. 2023. Vol. 14. – P. 1330312.
 46. Dong, Z. Anticancer mechanisms and potential anticancer applications of antimicrobial peptides and their nano agents / Z. Dong, X. Zhang, Q. Zhang, et al. // *International Journal of Nanomedicine*. 2024. Vol. 19. – P. 1017–1039.
 47. Drake, J.W. Rates of spontaneous mutation / J.W. Drake, B. Charlesworth, D. Charlesworth, J.F. Crow // *Genetics*. 1998. Vol. 148. № 4. – P. 1667–1686.
 48. Ebrahimi, L. Effect of an entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, on haemocyte profile and phenoloxidase activity of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* / L. Ebrahimi, G. Niknam, G.B. Dunphy, M. Toorchi // *Biocontrol Science and Technology*. 2014. Vol. 24. № 12. – P. 1383–1393.

49. Edison, A. Bulk segregant analysis reveals genomic regions associated with imidacloprid resistance in the Colorado potato beetle / A. Edison, N. Nariman, P. Duchon, S. Xu // *Ecology and Evolution*. 2025. Vol. 15. № 11. – P. e72527.
50. Efimova, S.S. Regulation of the pore-forming activity of Cecropin A by local anesthetics / S.S. Efimova, R.Y. Medvedev, E.G. Chulkov, L.V. Schagina, O.S. Ostroumova // *Cell and Tissue Biology*. 2018. Vol. 12. № 4. – P. 331–341.
51. Ehrenstein, G. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers / G. Ehrenstein, H. Lecar // *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1977. Vol. 10. № 3. – P. 233–240.
52. Eleftherianos, I. Haemocyte-mediated immunity in insects: cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites / I. Eleftherianos, C. Heryanto, T. Bassal, W. Zhang, G. Tettamanti, A. Mohamed // *Immunology*. 2021. Vol. 164. № 3. – P. 401–432.
53. Eleftherianos, I. Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis / I. Eleftherianos, C. Revenis // *Journal of Innate Immun*. 2011. Vol. 3. № 1. – P. 28–33.
54. Elhag, O. Screening, expression, purification and functional characterization of novel antimicrobial peptide genes from *Hermetia illucens* (L.) / O. Elhag, D. Zhou, Q. Song [et al.] // *PLoS ONE*. 2017. Vol. 12. № 1. – P. e0169582.
55. Endo, Y. Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis / Y. Endo, A. Glück, I.G. Wool // *Journal of Molecular Biology*. 1991. Vol. 221. № 1. – P. 193–207.
56. Erickson, M.C. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken manure by larvae of the black soldier fly / M.C. Erickson, M. Islam, C. Sheppard, J. Liao, M.P. Doyle // *Journal of Food Prot.* 2004. Vol. 67. № 4. – P. 685–690.
57. Erturk-Hasdemir, D. Two roles for the *Drosophila* IKK complex in the activation of Relish and the induction of antimicrobial peptide genes / D. Erturk-Hasdemir, M. Broemer, F. Leulier [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 2009. Vol. 106. № 24. – P. 9779–9784.

58. Falabella, P. Functional amyloids in insect immune response / P. Falabella, L. Riviello, M. Pascale [et al.] // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2012. Vol. 42. – P. 203-211.
59. Fehlbauer, P. Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides / P. Fehlbauer, P. Bulet, L. Michaut, M. Lagueux, W.F. Broekaert, C. Hetru, J.A. Hoffmann // *Journal of Biological Chemistry*. 1994. Vol. 269. № 52. – P. 33159–33163.
60. Feng, P. Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity / P. Feng, Y. Shang, K. Cen, C. Wang // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2015. Vol. 112. № 36. – P. 11365–11370.
61. Fiedler, H.P. Nikkomycins: microbial inhibitors of chitin synthase / H.P. Fiedler, R. Kurth, J. Langhärig, J. Delzer, H. Zähler // *Journal of Chem Technol Biotechnol*. 1982. Vol. 32. № 1–6. – P. 271–280.
62. Filomeni, G. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs / G. Filomeni, D. De Zio, F. Cecconi // *Cell Death Differentiation*. 2015. Vol. 22. № 3. – P. 377–388.
63. 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. № 6669. – P. 806–811.
64. Free, S.J. Fungal cell wall organization and biosynthesis / S.J. Free // In: T. Friedmann, J.C. Dunlap, F.G. Stephen, eds. *Advances in Genetics*. – New York: Academic Press, 2013. – P. 33–82.
65. Gaddelapati, S.C. Cap 'n' collar C regulates genes responsible for imidacloprid resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* / S.C. Gaddelapati, M. Kalsi, A. Roy, S.R. Palli // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2018. Vol. 99. – P. 54–62.
66. Ganesan, S. NF- κ B/Rel proteins and the humoral immune responses of *Drosophila melanogaster* / S. Ganesan, K. Aggarwal, N. Paquette, N. Silverman // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2011. Vol. 349. – P. 25-60.

67. 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. № 2. – P. 171–178.
68. García-Robles, I. Proteomic insights into the immune response of the Colorado potato beetle larvae challenged with *Bacillus thuringiensis* / I. García-Robles, J. De Loma, M. Capilla [et al.] // *Developmental and Comparative Immunology*. 2020. Vol. 104. – P. 103525.
69. Garred, P. Mannose-binding lectin and its genetic variants / P. Garred, F. Larsen, J. Seyfarth, R. Fujita, H.O. Madsen // *Genes and Immunity*. 2006. Vol. 7. № 2. – P. 85–94.
70. Gasteiger, E. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server / E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker [et al.] // In: J. M. Walker, ed. *The Proteomics Protocols Handbook*. – 1st ed. – Totowa (NJ): Humana Press, 2005. – P. 571–607.
71. Geng, T. JAK/STAT signaling pathway-mediated immune response in silkworm (*Bombyx mori*) challenged by *Beauveria bassiana* / T. Geng, L.D.D. Lv, Y.X. Huang, C.X. Hou, G.X. Qin, X.J. Guo // *Gene*. 2016. Vol. 595. № 1. – P. 69–76.
72. Geourjon, C. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments / C. Geourjon, G. Deléage // *Computer Application in the Biosciences*. 1995. Vol. 11. № 6. – P. 681–684.
73. Gerardo, N.M. Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrtosiphon pisum* / N.M. Gerardo, B. Altincicek, C. Anselme [et al.] // *Genome Biology*. 2010. Vol. 11. № 2. – P. R21.
74. Gong, H. How do antimicrobial peptides disrupt the lipopolysaccharide membrane leaflet of Gram-negative bacteria? / H. Gong, X. Hu, L. Zhang [et al.] // *Journal of Colloid Interface Science*. 2023. Vol. 637. – P. 182–192.
75. Govaere, L. Transcriptome and proteome analyses to investigate the molecular underpinnings of cold response in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* / L. Govaere, M.D. Morin, J.J. Frigault, S. Boquel, A. Cohen, S.G. Lamarre, P.J. Morin // *Cryobiology*. 2019. Vol. 88. – P. 54–63.

76. Guan, R.B. A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi / R.B. Guan, H.C. Li, Y.J. Fan [et al.] // Journal of Biological Chemistry. 2018. Vol. 293. № 16. – P. 6011–6021.
77. Guilhelmelli, F. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance / F. Guilhelmelli, N. Vilela, P. Albuquerque, L. Derengowski, I. Silva-Pereira, C. Kyaw // Frontiers in Microbiology. 2013. Vol. 4. – P. 353.
78. Hancock, R.E. Peptide antibiotics / R.E.W. Hancock, D.S. Chapple // Antimicrobial Agents Chemotherapy. 1999. Vol. 43. № 6. – P. 1317–1323.
79. Hannon, G.J. RNA interference / G.J. Hannon // Nature. 2002. Vol. 418. № 6894. – P. 244–251.
80. Hashimoto, M. An RNA polymerase inhibitor, cyclothiazomycin B1, and its isomer / M. Hashimoto, T. Murakami, K. Funahashi [et al.] // Bioorganic and Medicinal Chemistry. 2006. Vol. 14. № 23. – P. 8259–8270.
81. Hatakeyama, T. C-type lectin-like carbohydrate recognition of the hemolytic lectin CEL-III containing ricin-type β -trefoil folds / T. Hatakeyama, H. Unno, Y. Kouzuma [et al.] // Journal of Biological Chemistry. 2007. Vol. 282. № 52. – P. 37826–37835.
82. Hatakeyama, T. Oligomerization of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* induced by the binding of carbohydrate ligands / T. Hatakeyama, M. Furukawa, H. Nagatomo, N. Yamasaki, T. Mori // Journal of Biological Chemistry. 1996. Vol. 271. № 28. – P. 16915–16920.
83. Hazes, B. The (QxW)₃ domain: a flexible lectin scaffold / B. Hazes // Protein Science. 1996. Vol. 5. № 8. – P. 1490–1501.
84. Helmerhorst, E.J. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion / E.J. Helmerhorst, P. Breeuwer, W. van't Hof [et al.] // Journal of Biological Chemistry. 1999. Vol. 274. № 11. – P. 7286–7291.
85. Helmerhorst, E.J. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species / E.J. Helmerhorst, R.F. Troxler, F.G. Oppenheim // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 2001. Vol. 98. № 25. – P. 14637–14642.

- 86.Hillyer, J. F. Insect immunology and hematopoiesis / J. F. Hillyer // Development and Comparative Immunology. 2016. № 58. – P. 102-118.
- 87.Houtz, P. Recruitment of adult precursor cells underlies limited repair of the infected larval midgut in *Drosophila* / P. Houtz, A. Bonfini, X. Bing, N. Buchon // Cell Host and Microbe. 2019. Vol. 26. № 3. – P. 412-425.
- 88.Hu, Y. Functional divergence of plant-derived thaumatin-like protein genes in two closely related whitefly species / Y. Hu, C. Gong, Z. Yang, H. Han, T. Tian, X. Yang, W. Xie, S. Wang, Q. Wu, X. Zhou, T.C.J. Turlings, Z. Guo, Y. Zhang // Advanced Science. 2025. Vol. 12. № 16. – P. e2502193.
- 89.Hultmark, D. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* / D. Hultmark, H. Steiner, T. Rasmuson, H.G. Boman // European Journal of Biochemistry. 1980. Vol. 106. № 1. – P. 7-16.
- 90.Hussain, A. Susceptibility and immune defence mechanisms of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) against entomopathogenic fungal infections / A. Hussain, M. Rizwan-Ul-Haq, H. Al-Ayedh, A.M. AlJabr // International Journal of Molecular Science. 2016. Vol. 17. № 9. – P. 1518.
- 91.Ikeda, M. TMPDB: a database of experimentally-characterized transmembrane topologies / M. Ikeda, M. Arai, T. Okuno, T. Shimizu // Nucleic Acids Research. 2003. Vol. 31. № 1. – P. 406–409.
- 92.Imamura, M. Acaloleptins A: inducible antibacterial peptides from larvae of the beetle, *Acalolepta luxuriosa* / M. Imamura, S. Wada, N. Koizumi, T. Kadotani, K. Yaoi, R. Sato, H. Iwahana // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 1999. Vol. 40. № 2. – P. 88–98.
- 93.Imamura, M. Multipeptide precursor structure of acaloleptin A isoforms, antibacterial peptides from the Udo longicorn beetle, *Acalolepta luxuriosa* / M. Imamura, S. Wada, K. Ueda, A. Saito, N. Koizumi, H. Iwahana, R. Sato // Developmental and Comparative Immunology. 2009. Vol. 33. № 10. – P. 1120–1127.

94. Imler, J.L. Toll receptors in *Drosophila*: a family of molecules regulating development and immunity / J.L. Imler, J.A. Hoffmann // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2002. Vol. 270. – P. 63-79.
95. Islam, W. Insect-fungal-interactions: a detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests / W. Islam, M. Adnan, A. Shabbir [et al.] // *Microbial Pathogenesis*. 2021. Vol. 159. – P. 105122.
96. Janeway, C.A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology / C.A. Janeway, Jr. // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1989. Vol. 54. Pt 1. – P. 1–13.
97. Jang, H.A. Current status of immune deficiency pathway in *Tenebrio molitor* innate immunity / H.A. Jang, M.A.M. Kojour, B.B. Patnaik, Y.S. Han, Y.H. Jo // *Frontiers in Immunology*. 2022. Vol. 13. – P. 906192.
98. Jaronski, S.T. Mass production of entomopathogenic fungi—state of the art / S.T. Jaronski // *Mass Production of Beneficial Organisms*. 2nd ed. / ed. J.A. Morales-Ramos, M.G. Rojas, D.I. Shapiro-Ilan. Academic Press, 2023. P. 317–357.
99. Jenssen, H. Peptide antimicrobial agents / H. Jenssen, P. Hamill, R.E.W. Hancock // *Clinical Microbiology Reviews*. 2006. Vol. 19. № 3. – P. 491–511.
100. Jin, G. Human antimicrobial peptides and cancer / G. Jin, A. Weinberg // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2019. Vol. 88. – P. 156- 162.
101. Julian-Chávez, B. Silencing ACE1 gene with dsRNA of different lengths impairs larval development in *Leptinotarsa decemlineata* / B. Julian-Chávez, T.S. Siqueiros-Cendón, J.A. Torres-Castillo [et al.] // *Insects*. 2024. Vol. 15. № 12. – P. 1000.
102. Kallio, J. Functional analysis of immune response genes in *Drosophila* identifies JNK pathway as a regulator of antimicrobial peptide gene expression in S2 cells / J. Kallio, A. Leinonen, J. Ulvila, S. Valanne, R.A. Ezekowitz, M. Rämet // *Microbes and Infection*. 2005. Vol. 7. № 5–6. – P. 811–819.
103. Kanost, M.R. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta* / M.R. Kanost, H. Jiang, X.Q. Yu // *Immunological Reviews*. 2004. Vol. 198. – P. 97–105.

104. Kato, D. Analysis of the Toll and Spaetzle genes involved in Toll pathway-dependent antimicrobial gene induction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) / D. Kato, K. Miura, K. Yokoi // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24. № 2. – P. 1523.
105. Kavanagh, K. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential / K. Kavanagh, S. Dowd // Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2004. Vol. 56. № 3. – P. 285–289.
106. Kaya, S. Hemocytes: central drivers of antimicrobial peptide expression and immune proteins in both cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* / S. Kaya, T. Turgut Genç, M. Günay // Entomologia Experimental et Applicata. 2025. Vol. 173. № 10–11. – P. 1000–1010.
107. Keshavarz, M. *Tenebrio molitor* PGRP-LE plays a critical role in gut antimicrobial peptide production in response to *Escherichia coli* / M. Keshavarz, Y.H. Jo, T.T. Edosa, Y.S. Han // Frontiers in Physiology. 2020. Vol. 11. – P. 320.
108. Keshavarz, M. TmRelish is required for regulating the antimicrobial responses to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in *Tenebrio molitor* / M. Keshavarz, Y.H. Jo, B.B. Patnaik, K.B. Park, H.J. Ko, C.E. Kim [et al.] // Scientific Reports. 2020. Vol. 10. № 1. – P. 4258.
109. Khan, S.A. Recent trends in insect gut immunity / S.A. Khan, A.M.M. Kojour, Y.S. Han // Frontiers of Immunology. 2023. Vol. 14. – P. 1272143.
110. Kim, D.H. Identification and expression analysis of a novel R-type lectin from the coleopteran beetle, *Tenebrio molitor* / D.H. Kim, B.B. Patnaik, G.W. Seo, S.M. Kang, Y.S. Lee, B.L. Lee, Y.S. Han // Journal of Invertebrate Pathology. 2013. Vol. 114. № 3. – P. 226–229.
111. Kiu, H. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways / H. Kiu, S.E. Nicholson // Growth Factors. 2012. Vol. 30. № 1-2. – P. 88-106.
112. Kleino, A. The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response / A. Kleino, N. Silverman // Developmental and Comparative Immunology. 2014. Vol. 42. № 1. – P. 25-35.

113. Kojour, A.M.M. Current knowledge of immune priming in invertebrates, emphasizing studies on *Tenebrio molitor* / A.M.M. Kojour, S. Baliarsingh, H.A. Jang [et al.] // *Developmental and Comparative Immunology*. 2022. Vol. 127. – P. 104284.
114. Konopická, J. Isolation and identification of entomopathogenic fungi strains for Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) control / J. Konopická, O. Skoková Habuštová [et al.] // *Journal of Applied Microbiology*. 2024. Vol. 135. № 9. – P. 10213.
115. Koyama, H. Peptidoglycan recognition protein genes and their roles in the innate immune pathways of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* / H. Koyama, D. Kato, C. Minakuchi, T. Tanaka, K. Yokoi, K. Miura // *Journal of Invertebrate Pathology*. 2015. Vol. 132. – P. 86–100.
116. Krautz, R. Damage signals in the insect immune response / R. Krautz, B. Arefin, U. Theopold // *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5. – P. 342.
117. Kryukov, V. 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. – P. 338–358.
118. Kryukov, V. Ecological preferences of *Metarhizium* spp. from Russia and neighboring territories and their activity against Colorado potato beetle larvae / V. Kryukov, O. Yaroslavtseva, M. Tyurin [et al.] // *Journal of Invertebrate Pathology*. 2017. Vol. 149. – P. 1–7.
119. Kryukov, V.Y. Bacterial decomposition of insects post-*Metarhizium* infection: possible influence on plant growth / V.Y. Kryukov, M.R. Kabilov, N. Smirnova [et al.] // *Fungal Biology*. 2019. Vol. 123. № 1. – P. 927–935.
120. Kryukov, V.Y. Comparative analysis of the immune response of the wax moth *Galleria mellonella* after infection with the fungi *Cordyceps militaris* and *Metarhizium robertsii* / V.Y. Kryukov, N.A. Kryukova, O.G. Tomilova [et al.] // *Microbial Pathogenesis*. 2020. Vol. 141. – P. 103995.

121. 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, Y.A. Noskov, V.V. Glupov // *Insects*. 2022. Vol. 13. № 12. – P. 1168.
122. Kryukov, V.Y. Fungal infection dynamics in response to temperature in the lepidopteran insect *Galleria mellonella* / V.Y. Kryukov, O.N. Yaroslavtseva, M.M.A. Whitten [et al.] // *Insect Science*. 2018. Vol. 25. № 3. – P. 454–466.
123. Kryukov, V.Y. Fungus *Metarhizium robertsii* and neurotoxic insecticide affect gut immunity and microbiota in Colorado potato beetles / V.Y. Kryukov, U. Rotskaya, O. Yaroslavtseva [et al.] // *Scientific Reports*. 2021. Vol. 11. № 1. – P. 1299.
124. Kryukov, V.Y. Insecticidal and immunosuppressive effect of ascomycete *Cordyceps militaris* on the larvae of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* / V.Y. Kryukov, O.N. Yaroslavtseva, I.M. Dubovskiy, M.V. Tyurin, N.A. Kryukova, V.V. Glupov // *Biology Bulletin*. 2014. Vol. 41. № 3. – P. 276–283.
125. Kryukov, V.Y. Involvement of bacteria in the development of fungal infections in the Colorado potato beetle / V.Y. Kryukov, E. Kosman, I. Slepneva [et al.] // *Insect Science*. 2025. Vol. 32. № 2. – P. 600–620.
126. Kumar, A. Sequencing, de novo assembly and annotation of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, transcriptome / A. Kumar, L. Congiu, L. Lindström, S. Piironen, M. Vidotto, A. Grapputo // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. № 1. – P. e86012.
127. Kumar, S. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura // *Molecular Biology and Evolution*. 2018. Vol. 35. № 6. – P. 1547–1549.
128. La Rocca, P. Simulation studies of the interaction of antimicrobial peptides and lipid bilayers / P. La Rocca, P.C. Biggin, D.P. Tieleman, M.S.P. Sansom // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999. Vol. 1462. № 1–2. – P. 185–200.
129. Laplante, A.F. Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing / A.F. Laplante, V. Moulin, F.A. Auger [et al.] // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1998. Vol. 46. № 11. – P. 1291–1301.
130. Lavine, M.D. Insect hemocytes and their role in immunity / M.D. Lavine, M.R. Strand // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2002. Vol. 32. – P. 1295–1309.

131. Le, C.F. Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides / C.F. Le, C.M. Fang, S.D. Sekaran // *Antimicrob Agents Chemother*. 2017. Vol. 61. № 3. – P. e02340.
132. Lee, J. Antimicrobial peptides (AMPs) with dual mechanisms: membrane disruption and apoptosis / J. Lee, D.G. Lee // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 25. № 6. – P. 759–764.
133. Lee, K.M. Antifungal activities of recombinant antifungal protein by conjugation with polyethylene glycol / K.M. Lee, D.H. Kim, Y.H. Lee, B.S. Choi, J.H. Chung, B.L. Lee // *Molecules and Cells*. 1999. Vol. 9. № 4. – P. 410–416.
134. Leger, R.J. St. The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium anisopliae* / R.J. St. Leger, R.M. Cooper, A.K. Charnley // *Journal of Invertebrate Pathology*. 1988. Vol. 52. № 3. – P. 459-470.
135. Lemaitre, B. The Host Defense of *Drosophila melanogaster* / B. Lemaitre, J. Hoffmann // *Annual Review of Immunology*. 2007. Vol. 25. – P. 697-743.
136. Lenardon, M.D. Chitin synthesis and fungal pathogenesis / M.D. Lenardon, C.A. Munro, N.A.R. Gow // *Current Opinion in Microbiology*. 2010. Vol. 13. № 4. – P. 416–423.
137. Levashina, E.A. Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties / E.A. Levashina, S. Ohresser, P. Bulet, J.M. Reichhart, C. Hetru, J.A. Hoffmann // *European Journal of Biochemistry*. 1995. Vol. 233. № 3. – P. 694–700.
138. Li, J. Comparative analysis on the expression of inducible HSPs in the silkworm, *Bombyx mori* / J. Li, S.H. Moghaddam, X. Du, B.X. Zhong, Y.Y. Chen // *Molecular Biology Reports*. 2012. Vol. 39. № 4. – P. 3915–3923.
139. Liao, J. Identification of leaf chloroplast-specific promoter to efficiently control of Colorado potato beetle with reduced dsRNA accumulation in potato tubers / J. Liao, H. Rong, L. You [et al.] // *Pest Management Science*. 2023. Vol. 79. № 9. – P. 3326–3333.
140. Liao, J.H. A multivalent marine lectin from *Crenomytilus grayanus* possesses anti-cancer activity through recognizing globotriose Gb3 / J.H. Liao, C.T. Chien, H.Y.

- Wu [et al.] // Journal of American Chemistry Society. 2016. Vol. 138. № 14. – P. 4787–4795.
141. Lim, P.S. Epigenetic regulation of inducible gene expression in the immune system / P.S. Lim, J. Li, A.F. Holloway, S. Rao // Immunology. 2013. Vol. 139. № 3. – P. 285–293.
 142. Ling, E. Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta* / E. Ling, X.Q. Yu // Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2005. Vol. 35. – P. 1356-1366.
 143. Liu, D. The N-glycosylation-related genes as potential targets for RNAi-mediated pest control of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) / D. Liu, K. De Schutter, P. Chen, G. Smagghe // Pest Management Science. 2022. Vol. 78. № 9. – P. 3815–3822.
 144. Liu, X. A secreted C-type lectin in *Periplaneta americana* functioning in antibacterial activity, innate immune signaling and leg regeneration / X. Liu, N. Sun, S. Geng [et al.] // Frontiers in Immunology. 2026. Vol. 16. – P. 1730116.
 145. Lord, J.M. Ricin: structure, mode of action, and some current applications / J.M. Lord, L.M. Roberts, J.D. Robertus // Federation of American Societies for Experimental Biology Journal. 1994. Vol. 8. № 2. – P. 201–208.
 146. Lu, D. Bombyx mori Cecropin A has a high antifungal activity to entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* / D. Lu, T. Geng, C. Hou, Y. Huang, G. Qin, X. Guo // Gene. 2016. Vol. 583. № 1. – P. 29–35.
 147. Lu, H.L. Insect immunity to entomopathogenic fungi / H.L. Lu, R.J. St Leger // Advanced Genetic. 2016. Vol. 94. – P. 251-285.
 148. Maistrou, S. A constitutively expressed antifungal peptide protects *Tenebrio molitor* during a natural infection by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* / S. Maistrou, V. Paris, A.B. Jensen, J. Rolff, N.V. Meyling, C. Zanchi // Developmental and Comparative Immunology. 2018. Vol. 86. – P. 26–33.
 149. Makarova, O. Genomics of experimental adaptation of *Staphylococcus aureus* to a natural combination of insect antimicrobial peptides / O. Makarova, P. Johnston, A.

- Rodriguez-Rojas, B. El Shazely, J.M. Morales, J. Rolff // *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8. – P. 15359.
150. Manniello M.D. Insect antimicrobial peptides: potential weapons to counteract the antibiotic resistance / M.D. Manniello, A. Moretta, R. Salvia [et al.] // *Cell and Molecular Life Science*. 2021. Vol. 78. № 9. – P. 4259-4282.
151. Mansoori, B. Mechanisms of immune system activation in mammals by small interfering RNA (siRNA) / B. Mansoori, A. Mohammadi, S. Shir Jang, B. Baradaran // *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 2016. Vol. 44. № 7. – P. 1589–1596.
152. Marieshwari, B.N. Insect phenoloxidase and its diverse roles: melanogenesis and beyond / B.N. Marieshwari, S. Bhuvaragavan, K. Sruthi, P. Mullainadhan, S. Janarthanan // *Journal of Comparative Physiology*. 2023. Vol. 193. № 1. – P. 1-23.
153. Martens, E. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States / E. Martens, A.L. Demain // *Journal of Antibiotics (Tokyo)*. 2017. Vol. 70. № 5. – P. 520-526.
154. 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.
155. Matz, J.M. Characterization and regulation of cold-induced heat shock protein expression in mouse brown adipose tissue / J.M. Matz, M.J. Blake, H.M. Tatelman, K.P. Lavoie, N.J. Holbrook // *American Journal of Physiology*. 1995. Vol. 269. № 1, Pt 2. – P. 38–47.
156. Mirieri, C.K. Stress in dipteran insects mass-reared for sterile insect technique applications / C.K. Mirieri, V.I.D. Ros, A.M.M. Abd-Alla, M.M. van Oers // *Insect Science*. 2025. Vol. 32. № 5. – P. 1495–1523.
157. Mishima, Y. The N-terminal domain of *Drosophila* Gram-negative binding protein 3 (GNBP3) defines a novel family of fungal pattern recognition receptors / Y. Mishima, J. Quintin, V. Aimanianda [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. 2009. Vol. 284. № 42. – P. 28687-28697.

158. 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 [et al.] // Scientific Reports. 2021. Vol. 11. № 1. – P. 6523.
159. Mizuhara, N. Antifungal thiopeptide cyclothiazomycin B1 exhibits growth inhibition accompanying morphological changes via binding to fungal cell wall chitin / N. Mizuhara, M. Kuroda, A. Ogita, T. Tanaka [et al.] // Bioorganic and Medicinal Chemistry. 2011. Vol. 19. № 17. – P. 5300–5310.
160. Moghaddam, M.R.B. The selective antifungal activity of *Drosophila melanogaster* metchnikowin reflects the species-dependent inhibition of succinate-coenzyme Q reductase / M.R.B. Moghaddam, T. Gross, A. Becker, A. Vilcinskas, M. Rahnamaeian // Scientific Reports. 2017. Vol. 7. – P. 1–9.
161. Moore, A.J. Antimicrobial activity of cecropins / A.J. Moore, W.D. Beazley, M.C. Bibby, D.A. Devine // Journal of Antimicrob Chemother. 1996. Vol. 37. № 6. – P. 1077–1089.
162. Moradi, S. Peptidomimetics and their applications in antifungal drug design / S. Moradi, S. Soltani, A.M. Ansari, S. Sardari // Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry. 2009. Vol. 8. № 4. – P. 327–344.
163. Moretta, A. A bioinformatic study of antimicrobial peptides identified in the black soldier fly (BSF) *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) / A. Moretta, R. Salvia, C. Scieuzo [et al.] // Scientific Reports. 2020. Vol. 10. – P. 16875.
164. Morin-Poulard, I. The *Drosophila* JAK-STAT pathway in blood cell formation and immunity / I. Morin-Poulard, A. Vincent, M. Crozatier // JAKSTAT. 2013. Vol. 2. № 3. – P. e25700.
165. Mourrain, P. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for post-transcriptional gene silencing and natural virus resistance / P. Mourrain, C. Béclin, T. Elmayan [et al.] // Cell. 2000. Vol. 101. № 5. – P. 533–542.
166. Mowlds, P. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans* / P. Mowlds, K. Kavanagh // Mycopathologia. 2008. Vol. 165. № 1. – P. 5–12.

167. Mrinal, N. Intron loss is associated with gain of function in the evolution of the gloverin family of antibacterial genes in *Bombyx mori* / N. Mrinal, J. Nagaraju // Journal of Biological Chemistry. 2008. Vol. 283. № 34. – P. 23376-23387.
168. Muhammad, A. The humoral immune response of the lepidopteran model insect, silkworm *Bombyx mori* L., to microbial pathogens / A. Muhammad, C. Sun, Y. Shao // Current Research in Insect Science. 2024. Vol. 6. – P. 100097.
169. Mukherjee, K. The entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* communicates with the insect host *Galleria mellonella* during infection / K. Mukherjee, A. Vilcinskas // Virulence. 2018. Vol. 9. № 1. – P. 402–413.
170. Murzin, A.G. β -Trefoil fold: patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors, interleukins-1 β and -1 α and fibroblast growth factors / A.G. Murzin, A.M. Lesk, C. Chothia // Journal of Molecular Biology. 1992. Vol. 223. № 2. – P. 531–543.
171. Muta, T. Purified horseshoe crab factor G. Reconstitution and characterization of the (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan-sensitive serine protease cascade / T. Muta, N. Seki, Y. Takaki, R. Hashimoto [et al.] // Journal of Biological Chemistry. 1995. Vol. 270. № 2. – P. 892–897.
172. Myllymäki, H. JAK/STAT pathway in *Drosophila* immunity / H. Myllymäki, M. Ramet // Scandinavian Journal of Immunology. 2014. Vol. 79. № 5. – P. 377-385.
173. Nachman, M.W. Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans / M.W. Nachman, S.L. Crowell // Genetics. 2000. Vol. 156. № 1. – P. 297–304.
174. Nakamura, T. Molecular diversity of the two sugar-binding sites of the β -trefoil lectin HA33/C (HA1) from *Clostridium botulinum* type C neurotoxin / T. Nakamura, T. Tono-zuka, S. Ito [et al.] // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2011. Vol. 512. № 1. – P. 69–77.
175. Nakamura, T. Sugar-binding sites of the HA1 subcomponent of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin / T. Nakamura, T. Tono-zuka, A. Ide, T. Yuzawa, K. Oguma, A. Nishikawa // Journal of Molecular Biology. 2008. Vol. 376. № 3. – P. 854–867.
176. Nakano, M. Primary structure of hemolytic lectin CEL-III from marine invertebrate *Cucumaria echinata* and its cDNA: structural similarity to the B-chain

- from plant lectin, ricin / M. Nakano, S. Tabata, K. Sugihara, Y. Kouzuma, M. Kimura, N. Yamasaki // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999. Vol. 1435. № 1–2. – P. 167–176.
177. Nakhleh, J. The melanization response in insect immunity / J. Nakhleh, L.E. Moussawi, M.A. Osta // *Advanced Insect Physiology*. 2017. Vol. 52. – P. 83–109.
178. Nappi, A.J. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity / A.J. Nappi, B.M. Christensen // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2005. Vol. 35. – P. 443–459.
179. Nesa, J. Antimicrobial peptides from *Bombyx mori*: a splendid immune defense response in silkworms / J. Nesa, A. Sadat, D.F. Buccini, A. Kati, A.K. Mandal, O.L. Franco // *RSC Advanced*. 2020. Vol. 10. № 1. – P. 512–523.
180. Nilsson, L. The mechanism of the protein-synthesis elongation cycle in eukaryotes. Effect of ricin on the ribosomal interaction with elongation factors / L. Nilsson, O. Nygård // *European Journal of Biochemistry*. 1986. Vol. 161. № 1. – P. 111–117.
181. Notova, S. Structure and engineering of tandem repeat lectins / S. Notova, F. Bonnardel, F. Lisacek, A. Varrot, A. Imberty // *Current Opinion in Structure Biology*. 2019. Vol. 62. – P. 39–47.
182. O'Shea, J.J. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease / J.J. O'Shea, R. Plenge // *Immunity*. 2012. Vol. 36. № 4. – P. 542–550.
183. Palli, S. Effects of low doses of a novel dsRNA-based biopesticide (Calantha) on the Colorado potato beetle / S.R. Palli, A. Alyokhin, B. Manley, T.B. Rodrigues, E. Barnes, K. Narva // *Journal of Economic Entomology*. 2023. Vol. 116. № 2. – P. 456–461.
184. Palli, S. Toxicity of a novel dsRNA-based insecticide to the Colorado potato beetle in laboratory and field trials / S.R. Palli, A. Alyokhin, B. Manley [et al.] // *Pest Management Science*. 2022. Vol. 78. № 9. – P. 3836–3848.
185. Pancer, Z. The evolution of adaptive immunity / Z. Pancer, M.D. Cooper // *Annual Review of Immunology*. 2006. Vol. 24. – P. 497–518.

186. Park, Y.K. Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action / Y.K. Park, K.S. Hahm // *BMB Reports*. 2005. Vol. 38. № 5. – P. 507–516.
187. Pascale, M. The Lepidopteran endoribonuclease-U domain protein P102 displays dramatically reduced enzymatic activity and forms functional amyloids / M. Pascale, S. Laurino, H. Vogel [et al.] // *Developmental and Comparative Immunology*. 2014. Vol. 47. № 1. – P. 129-139.
188. Pastor-Pareja, J.C. An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila* / J.C. Pastor-Pareja, M. Wu, T. Xu // *Disease Models and Mechanisms*. 2008. Vol. 1. № 3-4. – P. 144- 154.
189. Pélissié, B. Genome resequencing reveals rapid, repeated evolution in the Colorado potato beetle / B. Pélissié, Y.H. Chen, Z.P. Cohen [et al.] // *Molecular Biology and Evolution*. 2022. Vol. 39. № 2. – e223201.
190. Pelosi, P. Odorant-binding proteins / P. Pelosi // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1994. Vol. 29. № 3. – P. 199–228.
191. Pesch, Y. Chitinases and imaginal disc growth factors organize the extracellular matrix formation at barrier tissues in insects / Y. Pesch, D. Riedel, K. Patil, G. Loch, M. Behr // *Scientific Report*. 2016. Vol. 6. – P. 18340.
192. Petek, M. Validating the potential of double-stranded RNA targeting Colorado potato beetle mesh gene in laboratory and field trials / M. Petek, A. Coll, R. Ferenc, J. Razinger, K. Gruden // *Frontiers in Plant Science*. 2020. Vol. 11. – P. 1250.
193. Peumans, W.J. Lectins as plant defense proteins / W.J. Peumans, E.J.M. Van Damme // *Plant Physiology*. 1995. Vol. 109. № 2. – P. 347–352.
194. Polenogova, O.V. Influence of *Bacillus thuringiensis* and avermectins on gut physiology and microbiota in Colorado potato beetle: impact of enterobacteria on susceptibility to insecticides / O.V. Polenogova, Y.A. Noskov, O.N. Yaroslavtseva [et al.] // *PLoS One*. 2021. Vol. 16. № 3. – P. e0248704.
195. Pouny, Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes / Y. Pouny, D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas, Y. Shai // *Biochemistry*. 1992. Vol. 31. № 49. – P. 12416–12423.

196. Prentice, K. RNAi-based gene silencing through dsRNA injection or ingestion against the African sweet potato weevil *Cylas puncticollis* (Coleoptera: Brentidae) / K. Prentice, O. Christiaens, I. Pertry, A. Bailey, C. Niblett, M. Ghislain, G. Gheysen, G. Smagghe // Pest Management Science. 2017. Vol. 73. № 1. – P. 44–52.
197. Pulpitel, T. Tissue-specific immune gene expression in the migratory locust, *Locusta migratoria* / T. Pulpitel, M. Pernice, S.J. Simpson, F. Ponton // Insects. 2015. Vol. 6. № 2. – P. 368–380.
198. Qiu, P. A role for the Drosophila Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis / P. Qiu, P.C. Pan, S. Govind // Development. 1998. Vol. 125. № 10. – P. 1909–1920.
199. Ramirez, J.L. Multiple mosquito AMPs are needed to potentiate their antifungal effect against entomopathogenic fungi / J.L. Ramirez, K.J. Hampton, A.M. Rosales, E.J. Muturi // Frontiers in Microbiology. 2023. Vol. 13. – P. 1062383.
200. Regente, M. A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications / M. Regente, G.B. Taveira, M. Pinedo [et al.] // Current Microbiology. 2014. Vol. 69. № 1. – P. 88–95.
201. Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila / F. Ritossa // Experientia. 1962. Vol. 18. № 11. – P. 571–573.
202. 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 [et al.] // Frontiers in Plant Science. 2021. Vol. 12. – P. 728652.
203. Rong, H. Odorant binding protein 18 increases the pathogen resistance of the imported willow leaf beetle, *Plagioderia versicolora* / H. Rong, X. He, Y. Liu, M. Liu, X. Liu, M. Lu // Front Cellular and Infection Microbiology. 2024. Vol. 14. – P. 1360680.
204. Rosendo Machado, S. Genetic determinants of antiviral immunity in dipteran insects - Compiling the experimental evidence / S. Rosendo Machado, T. van der Most, P. Miesen // Developmental and Comparative Immunology. 2021. Vol. 119. – P. 104010.

205. 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, M. Tyurin, V.V. Glupov // Journal of Fungi. 2021. Vol. 7. № 5. – P. 364.
206. Roy, A. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction / A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang // Nature Protocol. 2010. Vol. 5. № 4. – P. 725–738.
207. Rutenber, E. Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å / E. Rutenber, B.J. Katzin, S. Ernst, E.J. Collins, D. Mlsna, M.P. Ready, J.D. Robertus // Proteins. 1991. Vol. 10. № 3. – P. 240–250.
208. Satyavathi, V.V. Nodulation: an unexplored cellular defense mechanism in insects / V.V. Satyavathi, A. Minz, J. Nagaraju // Cell Signaling. 2014. Vol. 26. – P. 1753-1763.
209. Schoville, S.D. A model species for agricultural pest genomics: the genome of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) / S.D. Schoville, Y.H. Chen, M.N. Andersson [et al.] // Scientific Reports. 2018. Vol. 8. – P. 1931.
210. Schuhmann, B. Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella* / B. Schuhmann, V. Seitz, A. Vilcinskas, L. Podsiadlowski // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 2003. Vol. 53. № 3. – P. 125–133.
211. Sheehan, G. Immune priming: the secret weapon of the insect world / G. Sheehan, G. Farrell, K. Kavanagh // Virulence. 2020. Vol. 11. – P. 238-246.
212. Shi, X.Q. Validation of reference genes for expression analysis by quantitative real-time PCR in *Leptinotarsa decemlineata* (Say) / X.Q. Shi, W.C. Guo, P.J. Wan [et al.] // BMC Research Notes. 2013. Vol. 6. – P. 93.
213. Shia, A.K.H. Toll-dependent antimicrobial responses in Drosophila larval fat body require Spatzle secreted by haemocytes / A.K.H. Shia, M. Glittenberg, G. Thompson, A.N.R. Weber, J.M. Reichhart, P. Ligoxygakis // Journal of Cell Science. 2009. Vol. 122. № 24. – P. 4505-4515.

214. Shukla, J.N. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects / J.N. Shukla, M. Kalsi, A. Sethi [et al.] // RNA Biology. 2016. Vol. 13. № 7. – P. 656–669.
215. Sijen, T. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing / T. Sijen, J. Fleenor, F. Simmer [et al.] // Cell. 2001. Vol. 107. № 4. – P. 465–476.
216. Soltani, S. Evaluation of structural features of membrane-acting antifungal peptides by artificial neural networks / S. Soltani, K. Keymanesh, S. Sardari // Journal of Biological Science. 2008. Vol. 8. № 4. – P. 834–845.
217. Soltani, S. In silico analysis of antifungal peptides: determining the lead template sequence of potent antifungal peptides / S. Soltani, K. Keymanesh, S. Sardari // Expert Opinion on Drug Discovery. 2007. Vol. 2. № 8. – P. 837–847.
218. St Leger, R. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease / R. St Leger, L. Joshi, M.J. Bidochka, D.W. Roberts // Proceeding of the National Academy of Sciences USA. 1996. Vol. 93. № 13. – P. 6349–6354.
219. Steiner, H. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity / H. Steiner, D. Hultmark, A. Engström, H. Bennich, H.G. Boman // Nature. 1981. Vol. 292. № 5820. – P. 246–248.
220. Stepanov, A.A. 2,4-Diacetylphloroglucinol modulates Candida albicans virulence / A.A. Stepanov, D.V. Poshvina, A.S. Vasilchenko // Journal of Fungi. 2022. Vol. 8. № 10. – P. 1018.
221. Stokes, B.A. Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals / B.A. Stokes, S. Yadav, U. Shokal, L.C. Smith, I. Eleftherianos // Frontiers in Microbiology. 2015. Vol. 6. – P. 19.
222. Strand, M.R. The insect cellular immune response / M.R. Strand // Insect Science. 2008. Vol. 15. – P. 1–14.
223. Sugumaran, M. Critical analysis of the melanogenic pathway in insects and higher animals / M. Sugumaran, H. Barek // International Journal of Molecular Sciences. 2016. Vol. 17. – P. 1753.

224. Sun, J.J. Activation of Toll pathway is different between Kuruma shrimp and *Drosophila* / J.J. Sun, S. Xu, Z.H. He, X.Z. Shi, X.F. Zhao, J.X. Wang // *Frontiers in Immunology*. 2017. Vol. 8. – P. 1151.
225. Takahashi-Nakaguchi, A. Pierisin, cytotoxic and apoptosis-inducing DNA ADP-ribosylating protein in cabbage butterfly / A. Takahashi-Nakaguchi, Y. Horiuchi, M. Yamamoto, Y. Totsuka, K. Wakabayashi // *Toxins*. 2024. Vol. 16. № 6. – P. 270.
226. Takamura-Enya, T. Mono(ADP-ribosylation) of 2'-deoxyguanosine residue in DNA by an apoptosis-inducing protein, pierisin-1, from cabbage butterfly / T. Takamura-Enya, M. Watanabe, Y. Totsuka [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2001. Vol. 98. № 22. – P. 12414–12419.
227. Takov, D. Coleopterans as model organisms in insect immunity: a review / D. Takov, P. Ostovich, M. Zubrik, D. Pilarska // *North- Western Journal of Zoology*. 2022. Vol. 18. № 1. – P. 104–111.
228. Tang, H. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila* / H. Tang // *Fly*. 2009. Vol. 3. – P. 105-111.
229. Tanji, T. Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster* / T. Tanji, X. Hu, A.N.R. Weber, Y.T. Ip // *Molecular and Cellular Biology*. 2007. Vol. 27. № 12. – P. 4578-4588.
230. Taylor, M.E. Binding of oligosaccharide ligands to the selectins requires additional interactions with the carbohydrate-recognition domains / M.E. Taylor, K. Drickamer // In: M.E. Taylor, K. Drickamer, eds. *Introduction to Glycobiology*. – Oxford: Oxford University Press, 2003. – P. 207.
231. Terada, D. Crystal structure of MytiLec, a galactose-binding lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* with cytotoxicity against certain cancer cell types / D. Terada, F. Kawai, H. Noguchi [et al.] // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. – P. 28344.
232. 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 [et al.] // *Journal of Insect Physiology*. 2011. Vol. 57. № 2. – P. 231–245.

233. Theis, T. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications / T. Theis, U. Stahl // Cellular and Molecular Life Science. 2004. Vol. 61. № 4. – P. 437–455.
234. Timofeev, S.A. Insect immunity against microsporidia / S.A. Timofeev, V.V. Dolgikh, Y.Y. Sokolova // Journal of Invertebrate Pathology. 2025. Vol. 213. – P. 108426.
235. Tomilova, O.G. Changes in antifungal defence systems during the intermoult period in the Colorado potato beetle / O.G. Tomilova, O.N. Yaroslavtseva, M.D. Ganina [et al.] // Journal of Insect Physiology. 2019. Vol. 116. – P. 106–117.
236. Tomilova, O.G. Immune-physiological aspects of synergy between avermectins and the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* in Colorado potato beetle larvae / O.G. Tomilova, V.Y. Kryukov, B.A. Duisembekov [et al.] // Journal of Invertebrate Pathology. 2016. Vol. 140. – P. 8–15.
237. Tonk, M. Insect antimicrobial peptides: potential tools for the prevention of skin cancer / M. Tonk, A. Vilcinskas, M. Rahnamaeian // Applied Microbiology and Biotechnology. 2016. Vol. 100. № 17. – P. 7397-7405.
238. Tsakas, S. Insect immunity and its signalling: an overview / S. Tsakas, V.J. Marmaras // Invertebr Surviv J. 2010. Vol. 7. – P. 228-238.
239. Tsaneva, M. 130 years of plant lectin research / M. Tsaneva, E.J.M. Van Damme // Glycoconjugate Journal. 2020. Vol. 37. № 5. – P. 533–551.
240. Tunaz, H. Nodulation reaction to fungal infections in larvae of *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) mediated by eicosanoids / H. Tunaz, C. Bengin, M.E.R. Kubilay // Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 2008. Vol. 32. – P. 11–18.
241. Tutar, L. Heat shock proteins; an overview / L. Tutar, Y. Tutar // Current Pharmaceutical Biotechnology. 2010. Vol. 11. № 2. – P. 216–222.
242. Ubukata, M. Structure and biological activity of neopeptins A, B and C, inhibitors of fungal cell wall glycan synthesis / M. Ubukata, M. Uramoto, J. Uzawa, K. Isono // Agricultural and Biological Chemistry. 1986. Vol. 50. № 2. – P. 357–365.

243. Uchida, T. Crystal structure of the hemolytic lectin CEL-III isolated from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*: implications of domain structure for its membrane pore-formation mechanism / T. Uchida, T. Yamasaki, S. Eto [et al.] // Journal of Biological Chemistry. 2004. Vol. 279. № 36. – P. 37133–37141.
244. Vaibhvi, V. Hemocytes and fat body cells, the only professional immune cell types in *Drosophila*, show strikingly different responses to systemic infections / V. Vaibhvi, S. Künzel, T. Roeder // Frontiers in Immunology. 2022. Vol. 13. – P. 1040510.
245. Valanne, S. The *Drosophila* Toll signaling pathway / S. Valanne, J.-H. Wang, M. Ramet // Journal of Immunology. 2011. Vol. 186. № 2. – P. 649-656.
246. Valero-Jiménez, C.A. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* / C.A. Valero-Jiménez, H. Wieggers, B.J. Zwaan, C.J. Koenraadt, J.A. van Kan // Journal of Invertebrate Pathology. 2016. Vol. 133. P. 41–49.
247. Vallet-Gely, I. Bacterial strategies to overcome insect defences / I. Vallet-Gely, B. Lemaitre, F. Boccard // Nature Reviews Microbiology. 2008. Vol. 6. № 4. – P. 302-313.
248. Van Damme, E.J.M. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles / E.J.M. Van Damme, W.J. Peumans, A. Barre, P. Rougé // Critical Reviews in Plant Sciences. 1998. Vol. 17. № 6. – P. 575–692.
249. Van Holle, S. Comparative study of lectin domains in model species: new insights into evolutionary dynamics / S. Van Holle, K. De Schutter, L. Eggermont, M. Tsaneva, L. Dang, E.J.M. Van Damme // International Journal of Molecular Sciences. 2017. Vol. 18. № 6. – P. 1136.
250. Van Holle, S. Messages from the past: new insights in plant lectin evolution / S. Van Holle, E.J.M. Van Damme // Frontiers in Plant Science. 2019. Vol. 10. – P. 36.
251. Vasta, G.R. Biological roles of lectins in innate immunity: molecular and structural basis for diversity in self/non-self recognition / G.R. Vasta, H. Ahmed, S. Tasumi, E.W. Odom, K. Saito // Advances in Experimental Medicine and Biology. 2007. Vol. 598. – P. 389–406.

252. Vasta, G.R. Galectins in teleost fish: zebrafish (*Danio rerio*) as a model species to address their biological roles in development and innate immunity / G.R. Vasta, H. Ahmed, S.J. Du, D. Henrikson // Glycoconjugate Journal. 2004. Vol. 21. № 8. – P. 503–521.
253. Velayutham, V. Purification, characterization, and analysis of antibacterial activity of a serum lectin from the grub of rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros* / V. Velayutham, S. Shanmugavel, C. Somu, J. Sundaram // Process Biochemistry. 2017. Vol. 53. – P. 232–244.
254. Vey, A. Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during ecdysis / A. Vey, J. Fargues // Journal of Invertebrate Pathology. 1977. Vol. 30. № 2. – P. 207–215.
255. Vigers, G.P. X-ray structure of interleukin-1 receptor antagonist at 2.0-Å resolution / G.P. Vigers, P. Caffes, R.J. Evans, R.C. Thompson, S.P. Eisenberg, B.J. Brandhuber // Journal of Biological Chemistry. 1994. Vol. 269. № 17. – P. 12874–12879.
256. Vilches, C. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity / C. Vilches, P. Parham // Annual Review of Immunology. 2002. Vol. 20. – P. 217–251.
257. Wanchoo, A. Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in in vitro and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* / A. Wanchoo, M.W. Lewis, N.O. Keyhani // Microbiology (Reading). 2009. Vol. 155. Pt 9. – P. 3121–3133.
258. Wang, J. Destruxin A inhibits the hemocytin-mediated hemolymph immunity of host insects to facilitate *Metarhizium* infection / J. Wang, H. Hu, S. Pang[et al.] // Cell Reports. 2024. Vol. 43. № 2. – P. 113686.
259. Wang, Y. Interaction of beta-1,3-glucan with its recognition protein activates hemolymph proteinase 14, an initiation enzyme of the prophenoloxidase activation system in *Manduca sexta* / Y. Wang, H. Jiang // Journal of Biological Chemistry. 2006. Vol. 281. № 14. – P. 9271–9278.

260. Waterhouse, A.M. JalView Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench / A.M. Waterhouse, J.B. Procter, D.M. Martin, M. Clamp, G.J. Barton // *Bioinformatics*. 2009. Vol. 25. № 9. – P. 1189–1191.
261. Whelan, S. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach / S. Whelan, N. Goldman // *Molecular Biology and Evolution*. 2001. Vol. 18. № 4. – P. 691–699.
262. Wilhelm, L. Gene expression atlas of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) / L. Wilhelm, Y. Wang, S. Xu // *Scientific Data*. 2025. Vol. 12. – P. 299.
263. Willow, J. Highly variable dietary RNAi sensitivity among Coleoptera / J. Willow, E. Veromann // *Frontiers in Plant Science*. 2021. Vol. 12. – P. 790816.
264. Wu, J. Silencing chitin deacetylase 2 impairs larval-pupal and pupal-adult molts in *Leptinotarsa decemlineata* / J.J. Wu, Z.C. Chen, Y.W. Wang, K.Y. Fu, W.C. Guo, G.Q. Li // *Insect Molecular Biology*. 2019. Vol. 28. № 1. – P. 52–64.
265. Xiao X. A Mesh-Duox pathway regulates homeostasis in the insect gut / X. Xiao, L. Yang, X. Pang [et al.] // *Nature Microbiology*. 2017. Vol. 1. № 2. – P. 17020.
266. Xiao, G. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana* / G. Xiao, S.H. Ying, P. Zheng [et al.] // *Scientific Reports*. 2012. Vol. 2. – P. 483.
267. Xu, X.X. *Manduca sexta* gloverin binds microbial components and is active against bacteria and fungi / X.X. Xu, X. Zhong, H.Y. Yi, X.Q. Yu // *Developmental and Comparative Immunology*. 2012. Vol. 38. № 2. – P. 275-284.
268. Yan, J. Chromosome-level genome assembly of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* / J. Yan, C. Zhang, M. Zhang [et al.] // *Scientific Data*. 2023. Vol. 10. № 1. – P. 36.
269. Yang, J. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions / J. Yang, Y. Zhang // *Nucleic Acids Res*. 2015. Vol. 43. № W1. – P. W174–W181.
270. Yang, J. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction / J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, Y. Zhang // *Nat Methods*. 2015. Vol. 12. № 1. – P. 7–8.

271. Yang, L. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores / L. Yang, T.A. Harroun, T.M. Weiss, L. Ding, H.W. Huang // *Biophysical Journal*. 2001. Vol. 81. № 3. – P. 1475–1485.
272. Yaroslavtseva, O.N. Immunological mechanisms of synergy between fungus *Metarhizium robertsii* and bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* on Colorado potato beetle larvae / O.N. Yaroslavtseva, I.M. Dubovskiy, V.P. Khodyrev, B.A. Duisembekov, V.Y. Kryukov, V.V. Glupov // *Journal of Insect Physiology*. 2017. Vol. 96. – P. 14–20.
273. Yi, H. Insect antimicrobial peptides and their applications / H.Y. Yi, M. Chowdhury, Y.D. Huang, X.Q. Yu // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014. Vol. 98. № 13. – P. 5807–5822.
274. Yokoi, K. Antimicrobial peptide gene induction, involvement of Toll and IMD pathways and defense against bacteria in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* / K. Yokoi, H. Koyama, C. Minakuchi, T. Tanaka, K. Miura // *Results in Immunology*. 2012. Vol. 2. – P. 72–82.
275. Yokoi, K. Involvement of NF- κ B transcription factors in antimicrobial peptide gene induction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* / K. Yokoi, H. Koyama, W. Ito, C. Minakuchi, T. Tanaka, K. Miura // *Developmental and Comparative Immunology*. 2012. Vol. 38. № 3. – P. 342–351.
276. Yokoi, K. Pelle and Tube contribute to the Toll pathway-dependent antimicrobial peptide production in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) / K. Yokoi, D. Kato, K. Miura // *European Journal of Entomology*. 2022. Vol. 119. – P. 111–121.
277. Yokoi, K. RNA interference-based characterization of Caspar, DREDD and FADD genes in immune signaling pathways of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) / K. Yokoi, W. Ito, D. Kato, K. Miura // *European Journal of Entomology*. 2022. Vol. 119. – P. 23–35.
278. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms / M. Zasloff // *Nature*. 2002. Vol. 415. № 6870. – P. 389–395.

279. Zdybicka-Barabas, A. Innate Immunity in Insects: The Lights and Shadows of Phenoloxidase System Activation. / A. Zdybicka-Barabas, S. Stączek, M. Kunat-Budzyńska, M. Cytryńska // International Journal of Molecular Sciences. 2025. Vol. 4. № 26. – P. 1320.
280. Zhang, D. Antifungal peptides produced by actinomycetes and their biological activities against plant diseases / D. Zhang, Y. Lu, H. Chen [et al.] // Journal of Antibiotics. 2020. Vol. 73. № 5. – P. 265–282.
281. Zhang, L.B. Antioxidant enzymes and their contributions to biological control potential of fungal insect pathogens / L.B. Zhang, M.G. Feng // Applied Microbiology and Biotechnology. 2018. Vol. 102. № 12. – P. 4995–5004.
282. Zhang, W. An odorant-binding protein functions in fire ant social immunity interfacing with innate immunity / W. Zhang, X. Chen, J. Tian, C. Schal, A. Mohamed, L.S. Zang, Y. Xia, N.O. Keyhani // Open Biology. 2025. Vol. 15. № 2. – P. 240254.
283. Zhang, W. Spatial and temporal transcriptomic analyses reveal locust initiation of immune responses to *Metarhizium acridum* at the pre-penetration stage / W. Zhang, X. Zheng, J. Chen, N.O. Keyhani, K. Cai, Y. Xia // Developmental and Comparative Immunology. 2020. Vol. 104. – P. 103524.
284. Zhang, Y. Structural damage in the *C. elegans* epidermis causes release of STA-2 and induction of an innate immune response / Y. Zhang, W. Li, L. Li [et al.] // Immunity. 2015. Vol. 42. № 2. – P. 309–320.
285. Zhang, Z. Drosomycin, an essential component of antifungal defence in *Drosophila* / Z.T. Zhang, S.Y. Zhu // Insect Molecular Biology. 2009. Vol. 18. № 5. – P. 549–556.
286. Zhou, L. Transcription factor STAT enhanced antimicrobial activities in *Bombyx mori* / L. Zhou, Z. Dang, S. Wang, S. Li, Y. Zou, P. Zhao, Q. Xia, Z. Lu // International Journal of Biological Macromolecules. 2024. Vol. 254, Pt 2. – P. 127637.
287. Zhu, F. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* / F. Zhu, J. Xu, R. Palli, J. Ferguson, S.R. Palli // Pest Management Science. 2011. Vol. 67. № 2. – P. 175–182.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Праймеры для кПЦР. Праймеры для референсных генов *RpL4*, *RpL18*, *Arl2* и *Arl19* исходно взяты из работы Ши с коллегами (Shi et al., 2013). Последовательности праймеров референсных генов доработаны для условий эксперимента автором работы.

название гена	номер гена в базах NCBI Ldec 3 MD	F: прямой праймер (5' - 3') R: обратный праймер (5' - 3')	ПЦР продукт, п.н.
<i>RpL4</i>	LOC111509998	F: GAAACGAGCATTGCCCTTCC	113
		R: TCGCTGACACTGTAGGGTTG	
<i>RpL18</i>	LOC111516834	F: TAGAATCCTCAAAGCAGGTGGC	133
		R: GAACACCTGGAGCTGGACCAAAG	
<i>Arl2</i>	LOC111512786	F: CAAACAAGACTTACCTGGTGCT	140
		R: AAACCTCCAATCCCTCGTGAAG	
<i>Arl19</i>	LOC111513661	F: TGCGGTGCTGGTAAAACGAC	135
		R: TGACCTCCCAAATCCCAAACCTT	
<i>PGRP-LF</i>	LOC111511915	F: ACAATATCAACACGTCATCCCAGG	122
		R: CAGCCCCACGACGAGAATC	
<i>PGRP-SC2</i>	LOC111512324	F: GTTGTGCACCATTCCTGCTAC	176
		R: GCACCATGCCTATTCCATCCT	
<i>toll1_rec</i>	LOC111514365	F: TATGTGGAGTGGGGAAAGCC	147
		R: TGGTGGAGGCGTTGTAAGC	
<i>DorsalDif1</i>	LOC111503735	F: TGTGCGAAAAGGTGGCTAAAG	196
		R: ACTTGGGAGGGTTGGAAGTC	
<i>DorsalDif2</i>	LOC111516171	F: AGATCCTCCTTACAGGGCTCAT	81
		R: ACCTTGCAGATACCGTTCTTGTAG	
<i>NF-kappa-B</i>	LOC111518178	F: AAGCAGCGGTTTGATTCGTTC	171
		R: AACTCGTCCAAGTTCTCCAGG	
<i>Stat</i>	LOC111509439	F: AGGAGCAGAACACAGGGTAC	140
		R: TTTGCCTGGGAATTCTGTTGAC	
<i>cactus-like</i>	LOC111504585	F: CAGTTGGTCTGGTACGGAGC	181
		R: TTACTTTGTTGAATACGAGGACATTA	

Продолжение Таблицы 1. Праймеры для кПЦР.

название гена	номер гена в базах NCBI Ldec_3_MD	F: прямой праймер (5' - 3') R: обратный праймер (5' - 3')	ПЦР продукт, п.н.
<i>LdRBLk</i>	LOC141481981	F: TGGAAAGTTTGGGAGATGGAAC R: GAACTGTTGATTGTCGTCACCATG	134
<i>RBLn</i>	LOC111517731	F: CTTCAATTAATTCCGATGCAACTATTGGT R: ACATTTCTCGATCATTCAATTGGTTC	153
<i>attacin-34</i>	LOC111512686	F: TGAGAACTCCACAAAATATTCACCTTCG R: CTAAGGGTATGGCAGCAACAAC	98
<i>aca-17</i>	LOC111517834	F: TGGAATGTTGGAGGCAGCTAA R: ACTATCACAGATTGACAACTTATTGAGAA	88
<i>perlucin</i>	LOC111513833	F: TGTGAGAGGATACATATGACCCTTG R: CAATCTTGAACCTCCAGTCCAGTA	120
<i>holotricin-3</i>	LOC111516329	F: GTTATGACCTGTTTCGCTGCC R: CGTGGCTATATCCTCCGTGAT	130
<i>tenecin-3</i>	LOC111515395	F: CTTTGGCAGTCCTCATCGCA R: CCACCTTGATGTCCAGCCTC	160
<i>thaumatin</i>	LOC111502336	F: TGAGGATAGTTTTTCATTGCCACC R: TCTCCTTCAGGTCCACCAAATGT	159
<i>hsp70</i>	LOC111510126	F: ACCCCGAAGAAGTCAGCTC R: CCAGGCCGTAAGCGATG	214
<i>hsp90</i>	LOC111503387	F: GGGTGTAGTCGACTCTGAAGAC R: AGAGCTCCTCAAACAGTTCCAA	125
<i>OBP</i>	LOC111515132	F: AGGTGAATCATGAAGTGCATTGC R: GTGGTACCTCTCTGCTTCCTC	96
<i>catalase-56</i>	LOC111516285	F: TTCGCTATTAAATTCTACACCGAAGA R: CTTATGTGTGTCTTGGGATTTCCTT	137

Таблица 2. Праймеры для наработки дцРНК.

Мишень дцРНК	номер гена в базах NCBI Ldec_3_MD	F: прямой праймер (5' - 3') R: обратный праймер (5' - 3')	ПЦР продукт, п.н.
T7_gfp	LN515608.1	F: TAATACGACTCACTATAGGG AGTGGAGAGGGTGAAGGTGA	500
		R: TAATACGACTCACTATAGGG GGTAAGGACAGGGCCATC	
T7_Stat	LOC111509439	F: TAATACGACTCACTATAGGG AAGATACAGTGCCACTCCAG	237
		R: TAATACGACTCACTATAGGG TTCTGCCTCTGAAGTTTCTG	
T7_DorsalDif1	LOC111503735	F: TAATACGACTCACTATAGGG CTGTGTGACCAAGGACAATC	221
		R: TAATACGACTCACTATAGGG TATGAGCGAAACCAGTTCTG	
T7_DorsalDif2	LOC111516171	F: TAATACGACTCACTATAGGG TTCGCTCACAAAAACGACTC	260
		R: TAATACGACTCACTATAGGG TCCTTCACTACCTTTTCGCA	
T7_LdRBLk	LOC141481981	F: TAATACGACTCACTATAGGG CGGATCATATCGAAATTATCTGGA	227
		R: TAATACGACTCACTATAGGG TGTTGATTGTCGTCACCATG	

Таблица 3. Экспрессия генов паралогов каталазы у колорадского жука. Исходные данные работы Крюков с соавторами (Kryukov et al., 2026). Bb – ткани *L. decemlineata* обработанные грибом *B. bassiana* (Sar-31), Mr - ткани *L. decemlineata* обработанные грибом *M. robertsii* (MB-1), Hc – гемоциты, Fb - ткань жирового тела. Зелёным цветом выделен ген *catalase-56*.

	Базовые значения	log2FoldChange	p-value	Номер гена в базе NCBI	Белковый продукт
Bb_Hc	8318,5522	-0,14600781	0,208738509	gene-LOC111503833	catalase
	23431,6114	-1,35337581	4,27398E-05	gene-LOC111516285	catalase-like
	4717,1636	-1,57635638	9,07409E-19	gene-LOC111511045	catalase-like
	---	---	---	gene-LOC111516683	uncharacterized
Mr_Hc	8318,5522	0,0481957	0,675839104	gene-LOC111503833	catalase
	23431,6114	-2,0586547	5,61112E-09	gene-LOC111516285	catalase-like
	4717,1636	-1,63648647	5,17817E-20	gene-LOC111511045	catalase-like
	---	---	---	gene-LOC111516683	uncharacterized
Bb_Fb	90964,9051	-0,21103167	0,116669293	gene-LOC111503833	catalase
	43,1465	-1,37002347	0,000249942	gene-LOC111516285	catalase-like
	72,9479	-0,14206574	0,072706641	gene-LOC111511045	catalase-like
	---	---	---	gene-LOC111516683	uncharacterized
Mr_Fb	90964,9051	-0,32321245	0,033455308	gene-LOC111503833	catalase
	43,1465	-1,62066436	1,70202E-05	gene-LOC111516285	catalase-like
	72,9479	-0,1471566	0,194908987	gene-LOC111511045	catalase-like
	---	---	---	gene-LOC111516683	uncharacterized

* - uncharacterized: в сводную таблицу результатов транскриптома (Kryukov et al., 2026) не включались гены с низким уровнем экспрессии (baseMean) и/или с отсутствием статистически значимых изменений экспрессии (p-value).

Таблица 4. Список номеров рицин-подобных β -лектинов колорадского жука *L. decemlineata* по базам NCBI по аннотации Ldec_3.0 по состоянию на апрель 2026 года.

Литеры кПЦР	Цепь ДНК	Гены	мРНК	Белки	В работе Kryukov et al., 2026
k	отрицательная	LOC141481981	XM_074174484.1	XP_074030585.1	LdRBLk ¹
		(две изоформы)	XM_074174483.1	XP_074030585.1	
l	положительная	LOC111517731	XM_023173982.1	XP_023029750.1	RBL1
m	положительная	LOC111517723	XM_023173971.1	XP_023029739.1	RBL5
n	положительная	LOC111517721	XM_023173968.1	XP_023029736.1	RBL2

¹ – смотри Приложение Рис. 7

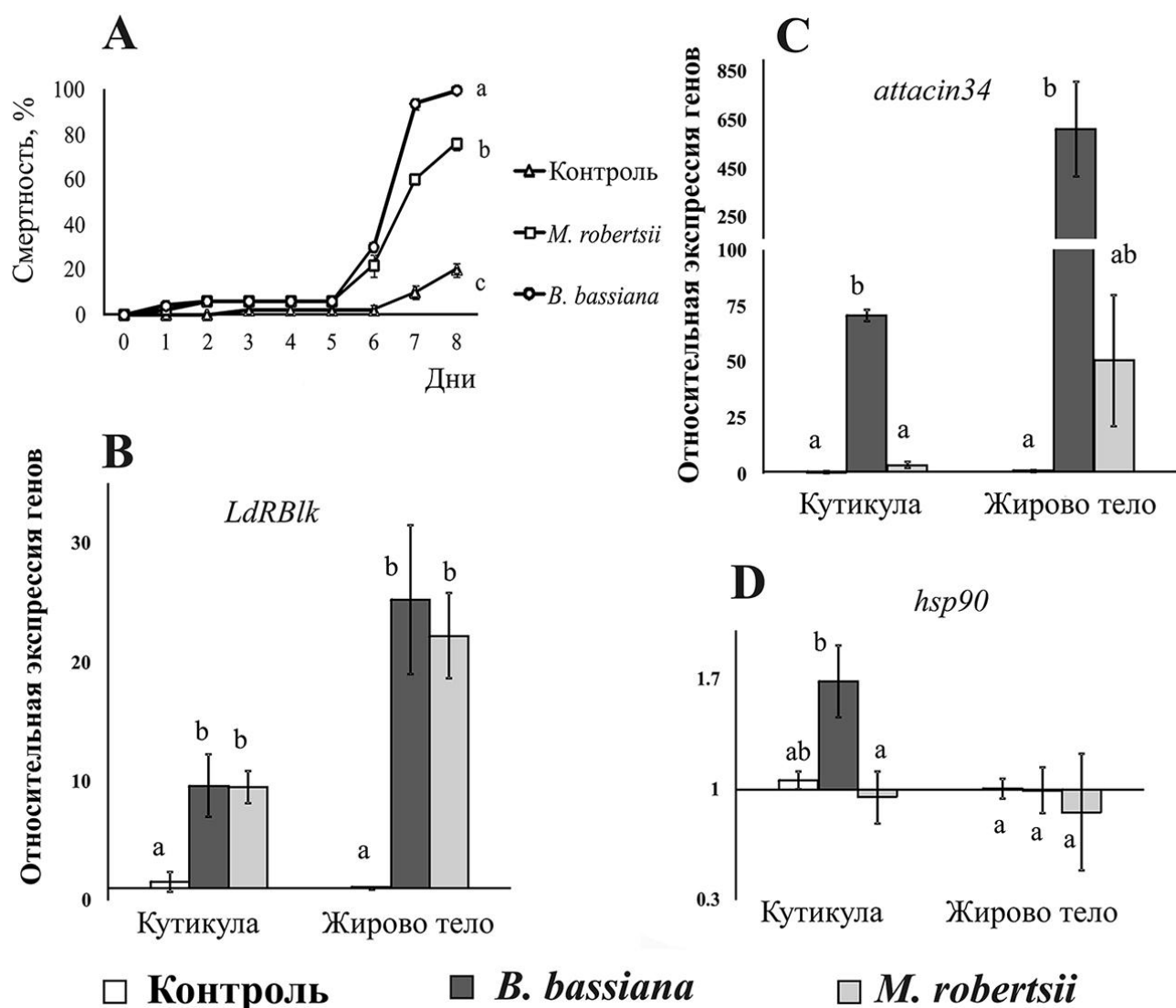


Рис. 1. Динамика смертности (А) и изменения относительной экспрессии генов *LdRBLk* (В), *attacin-34* (С) и *hsp90* (D) в кутикуле и жировом теле личинок колорадского жука после их погружения в суспензии *B. bassiana* и *M. robertsii* 5×10^6 конидий/мл через 48 часов после заражения. Данные нормализованы по референсным генам: рибосомальный белок L4 (*RpL4*) и фактор АДФ-рибозилирующий фактор 1 (*Arl19*). Ось Y показывает изменение в кратности относительно незараженных личинок, рассчитанное отдельно для каждой ткани. Разные буквы указывают на значимые различия между вариантами обработки (log-rank test $\chi^2 > 11,2$, $df = 1$, $p < 0,001$ для анализа смертности и тест Данна, $p < 0,05$ для экспрессии генов) (Rotskaya et al., 2021).

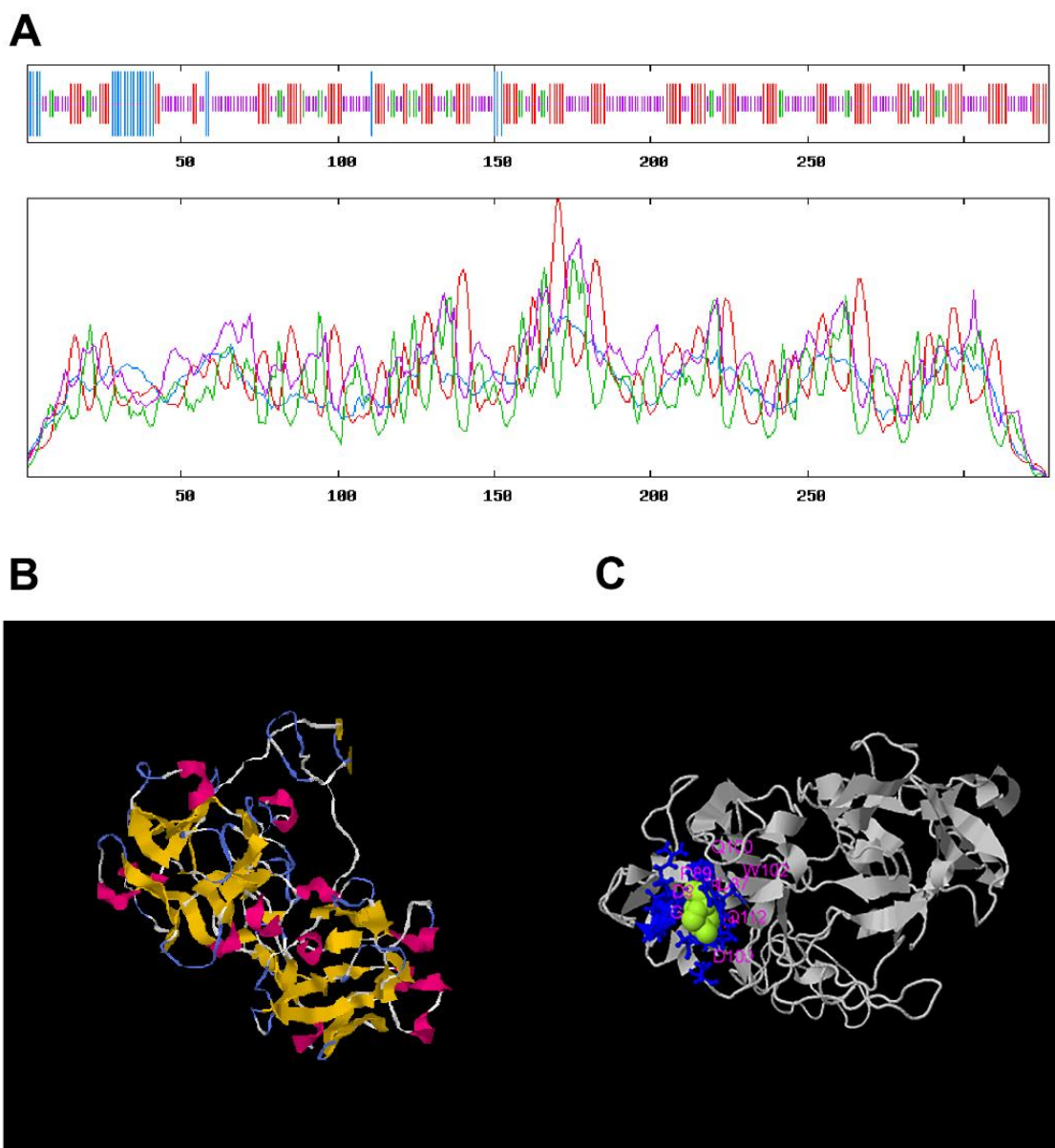


Рис. 2. Предсказанная вторичная и третичная структура β -лектина из рицинового токсина *R. communis* (RBL). **А.** Вторичная структура в онлайн-программе SOPMA. Штрихи и линии показаны синим, красным, зеленым и фиолетовым цветами, представляющими соответственно альфа-спираль, цепь, бета-поворот и неупорядоченные участки. **В.** Предсказанная модель третичной структуры белка, построенная программой I-TASSER. Модель 1. **С.** Предсказание сайта связывания лиганда для белка RBL программой I-TASSER. Предсказанный потенциальный лиганд — галактоза.

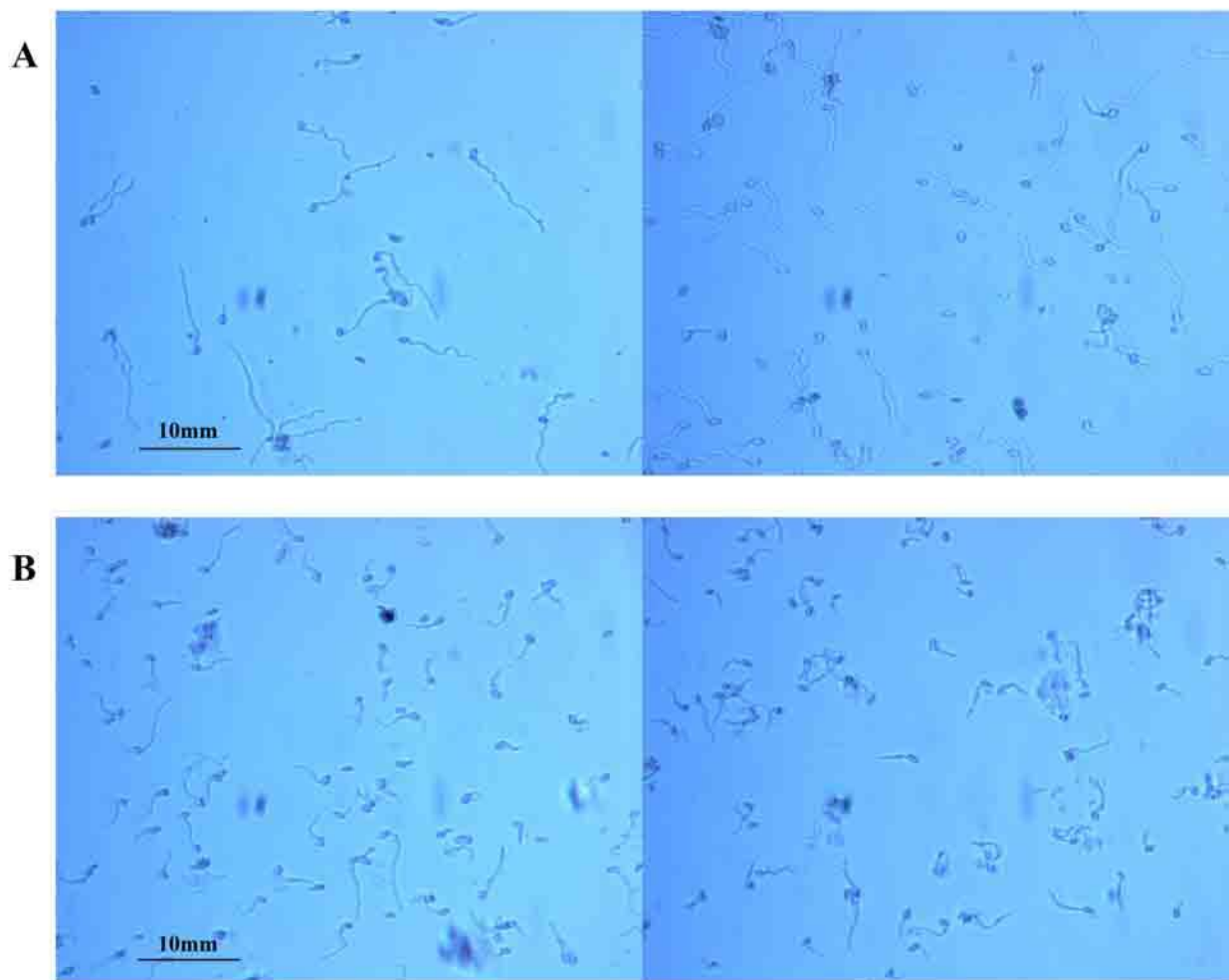


Рис. 3. Прорастание конидий *M. robertsii* (штамм P-72) под световым микроскопом в жидкой среде 1/4 SDAY через 12 ч в контроле (А) и при добавлении в среду рекомбинантного лектина LdRBLk в конечной концентрации 1 мкг/мл (В).

XP_074038059.1	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
XP_074038060.1	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
XP_074038061.1	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Consensus	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
XP_074038059.1	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
XP_074038060.1	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
XP_074038061.1	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
Consensus	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
XP_074038059.1	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
XP_074038060.1	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
XP_074038061.1	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Consensus	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
XP_074038059.1	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
XP_074038060.1	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
XP_074038061.1	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
Consensus	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
XP_074038059.1	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	631		
XP_074038060.1	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	631		
XP_074038061.1	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	631		
Consensus	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	631		

Рис. 4. Аминокислотное выравнивание белковых изоформ, синтезируемых с гена *DorsalDif2* (LOC111516171) *L. decemlineata*. Выравнивание аминокислотных последовательностей выполнено в программе Multalin version 5.4.1 (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>, дата обращения 20.04.2026)

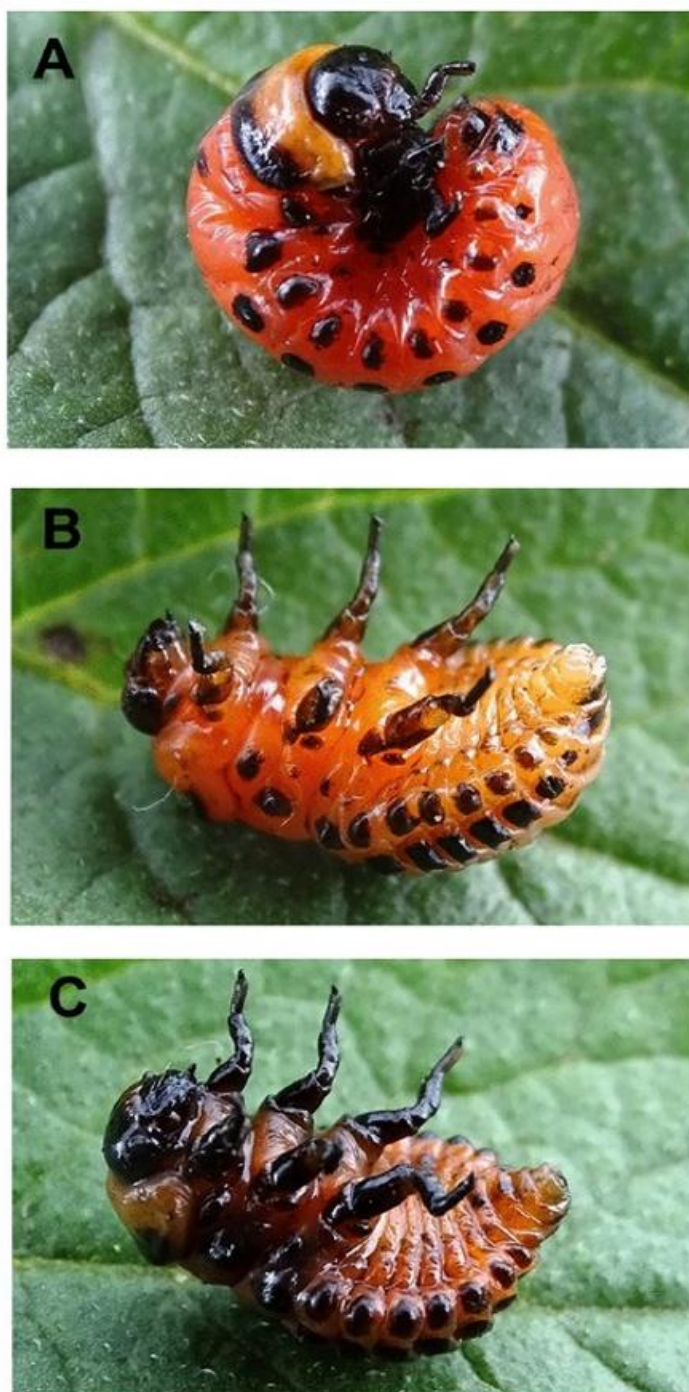


Рис. 5. Симптоматика вирусной инфекции личинки *L. decemlineata* IV возраста умершей от (предположительно) вирусной инфекции *Leptinoyarsa iflavirus* 1 или *Leptinotarsa solinvi-like virus* 1. А. – здоровая личинка. В. – личинка на первый день после смерти. С. – личинка на третий день после смерти. Согласно Antonets et al., (2024).

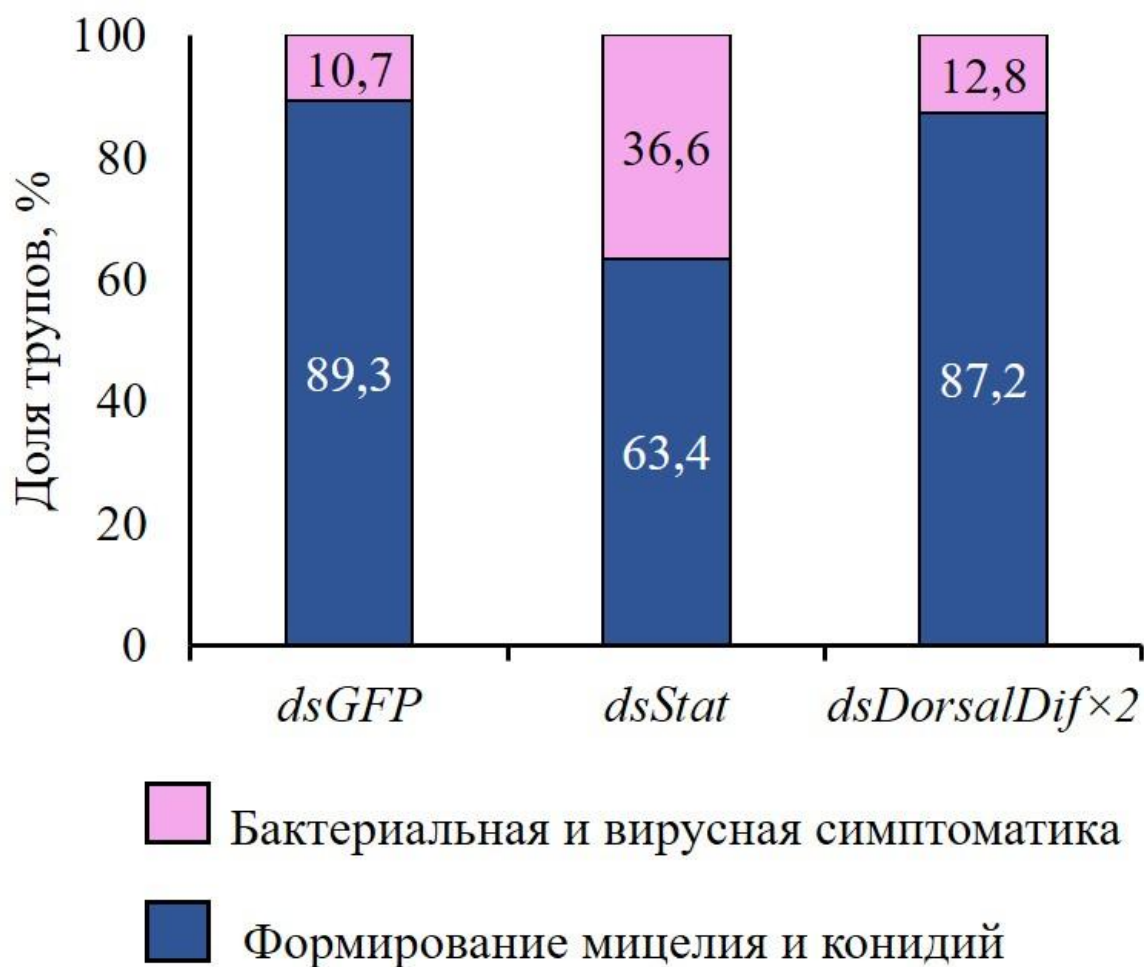


Рис. 6. Распределение по фенотипическим категориям погибших личинок IV возраста после инъекции целевой дцРНК и грибной инфекции *B. bassiana*. Трупы содержали во влажных камерах до проявления фенотипических признаков: формирования мицелия и конидий, бактериальной или вирусной симптоматики. Различия в распределении фенотипических категорий анализировали с использованием критерия χ^2 Пирсона ($\chi^2 = 5,9$; $p = 0,016$).



Рис 7. Две изоформы пептида LdRBLk, синтезируемые с гена LOC141481981. Данные по базам NCBI по аннотации Ldec_3.0 по состоянию на апрель 2026 года.