

## ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСТРАКЦИИ СИНТЕЗИРОВАННЫХ В БАКТЕРИЯХ ДВУХЦЕПОЧНЫХ РНК ДЛЯ БОРЬБЫ С ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМИ ПАТОГЕНАМИ ПОЛЕЗНЫХ НАСЕКОМЫХ И ВРЕДИТЕЛЯМИ

Р.Р. Фадеев<sup>1</sup>, В.В. Долгих<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург, г. Пушкин, Россия

РНК-интерференция (РНКи) – это описанный в конце двадцатого века процесс подавления транскрипционной активности генов у эукариотических организмов, который индуцируется попаданием в клетку комплементарных молекул двухцепочных РНК (дцРНК) [1]. Практически сразу после его открытия было показано успешное подавление активности генов у различных насекомых-вредителей, а также грибных и вирусных фитопатогенов [2–4]. К настоящему времени также показана возможность использования РНКи для борьбы с такими опасными внутриклеточными паразитами одомашненных насекомых, как микроспоридии [5–6].

Важным условием практического использования РНКи в сельскохозяйственной практике является высокая эффективность и низкая себестоимость наработки и выделения эффекторных молекул дцРНК. Для синтеза дцРНК были разработаны различные стратегии наработки в условиях *in vivo* и *in vitro*. Синтез *in vitro* позволяет получать чистые дцРНК, но сам метод является дорогостоящим. Напротив, синтез дцРНК *in vivo* в бактериях имеет значительно более низкую себестоимость, что важно при массовом производстве. В то же время он требует оптимизации не только условий наработки дцРНК в бактериях, но и их выделения.

В наших исследованиях мы провели работу по оптимизации условий экстракции и очистки дцРНК, синтезированных в бактериях *E. coli* HT115(DE3), и показали эффективность их возможного использования в сельскохозяйственной практике. В частности, было показано значительное подавление развитие инфекции медоносной пчелы *Apis mellifera*, вызванной таким внутриклеточным паразитом, как микроспоридия *Vairimorpha (Nosema) ceranae*. В целом, для борьбы с внутриклеточными патогенами полезных насекомых было бы удобнее использовать HIGS стратегию (англ. host-induced gene silencing), подразумевающую генную модификацию организма хозяина, но по причине сложной социальной структуры пчелиной семьи, данный подход сильно затруднён. В нашей работе наработанные в бактериях дцРНК добавляли в сахарный сироп при кормлении насекомых. Эффективность использования синтезированных в бактериях дцРНК, сопоставимая с эффективностью добавления в корм синтезированных *in vitro* молекул, была также показана на личинках колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata*.

Работа выполнена при поддержке РФФ, № 23-16-00247

### Литература

- 1 Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806–811.
- 2 Petek M., Coll A., Ferenc R., Razinger J., Gruden K. Validating the potential of double-stranded RNA targeting colorado potato beetle mesh gene in laboratory and field trial. *Frontiers of plant science*, 2020, 11: 1250 (doi: 10.3389/fpls.2020.01250).
- 3 Koch A., Biedenkopf D., Furch A., Weber L., Rossbach O., Abdellatef E., Linicus L., Johannsmeier J., Jelonek L., Goesmann A., Cardoza V., McMillan J., Mentzel T., Kogel K.H. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *PLOS Pathogens*, 2016, 12: e1005901 (doi: 10.1371/journal.ppat.1005901).
- 4 Tenllado F., Martínez-García B., Vargas M., Díaz-Ruiz J.R. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnology*, 2003, 3: 3 (doi: 10.1186/1472-6750-3-3).
- 5 Nitzan Paldi, Eitan Glick, Maayan Oliva, Yaron Zilberberg, Lucie Aubin, Jeffery Pettis, Yanping Chen, and Jay D. Evans. Effective Gene Silencing in a Microsporidian Parasite Associated with Honeybee (*Apis mellifera*) Colony Declines. *Applied and environmental microbiology*, Sept. 2010, p. 5960–5964 (doi:10.1128/AEM.01067-10)
- 6 He, N.; Zhang, Y.; Duan, X.L.; Li, J.H.; Huang, W. – F.; Evans, J.D.; DeGrandi-Hoffman, G.; Chen, Y.P.; Huang, S.K. RNA Interference-Mediated Knockdown of Genes Encoding Spore Wall Proteins Confers Protection against *Nosema ceranae* Infection in the European Honey Bee, *Apis mellifera*. *Microorganisms* 2021, 9, 505. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030505>