

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ИММУНИТЕТА РАСТЕНИЙ И ИХ КОЭВОЛЮЦИИ С НАСЕКОМЫМИ

А.В. Конарев

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

Эл. почта: alv-konarev@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 09.02.2017; принята к печати 05.03.2017

Огромное разнообразие растений и насекомых является результатом их коэволюции на протяжении сотен миллионов лет. Необходимость защиты тканей и органов, а также хранящихся в них энергетических и пластических материалов от фитофагов привела у растений к появлению многообразных и изощренных механизмов иммунитета. Наличие сложнейших поведенческих реакций, в том числе способности к выбору кормового растения по биохимическим, морфологическим и иным признакам и высокоорганизованной пищеварительной системы, и многие другие особенности насекомых-фитофагов обусловили у растений формирование механизмов иммунитета, в значительной мере независимых от механизмов иммунитета к фитопатогенным микроорганизмам. При этом защитные реакции растений против вредителей и патогенов могут быть сходными на молекулярном уровне передачи сигнала и запуска ответных реакций. Задействованные при этом гормональные системы могут взаимодействовать в антагонистической или синергетической манере, а фитофаги – как микроорганизмы, так и насекомые – способны с помощью эффекторов встраиваться в это взаимодействие для своей выгоды. Очень важна химическая составляющая защитных систем растений, охватывающая практически все классы вторичных метаболитов, которые оказывают прямое токсическое, репеллентное, антипитательное или иное негативное воздействие на фитофагов или привлекают энтомофагов. Широкий перечень механизмов их действия – от разрушения клеточных мембран до повышения затрат энергии и ресурсов на усвоение пищи. Разнообразны и механизмы обезвреживания защитных соединений растений насекомыми. В природной системе «растение-насекомое» каждый из ее элементов представляет собой сообщество разнообразных организмов. Симбионты, паразиты и патогены влияют на взаимодействие растений и насекомых и вовлечены в их коэволюцию. При создании форм растений, устойчивых к вредителям, важно учитывать возможные последствия применения того или иного защитного механизма в отношении не только отдельных особей, но также популяций вредителей и агроэкосистемы в целом. Использование механизмов, не стимулирующих ускоренную микроэволюцию вредителей, оказывает более щадящее воздействие на экосистему. В роли таких защитных факторов могут выступать, например, белковые ингибиторы пищеварительных ферментов насекомых. Понимание закономерностей коэволюции растений и насекомых и молекулярной природы адаптации фитофагов к защитным соединениям является необходимым условием для создания эффективных форм растений, устойчивых к вредителям.

Ключевые слова: иммунитет растений к насекомым, коэволюция растений и насекомых, протеиназы, α -амилазы, ингибиторы.

MOLECULAR ASPECTS OF PLANT IMMUNITY AND THEIR COEVOLUTION WITH INSECTS

A.V. Konarev

All-Russia Research Institute of Plant Protection, Saint Petersburg, Russia

E-mail: alv-konarev@yandex.ru

The immense variety of plants and insects has developed by their coevolution over hundreds millions years. The need to protect plant tissues and organs and of energy and building resources stored therein was the driving force of the development of numerous and sophisticated mechanisms of plant immunity. Because of complex behaviors of phytophagous insects, including their abilities to choose nutritional plants according to their biochemical, morphological and other features, and due to elaborate digestive systems, as well as many other characteristics, the mechanisms of plant immunity against insects are largely independent from those against microorganisms. However, at the level of the molecular mechanisms of signal transduction and response triggering, the modalities of plant protection against insects and microorganisms have much in common. Plant hormonal systems involved in the protective responses may interact in synergetic and antagonistic manners, and insects and microorganisms may interfere with these interactions for their benefit. In this regard, the chemical components of plant protective mechanisms, including virtually all classes of secondary metabolites, are important either by producing direct toxic, repellent, anti-nutritive and/or other deleterious effects on phytophages or by attracting entomophages. The numerous mechanisms of the effects of these substances range from destruction of cell membrane to increasing the cost of food assimilation. No less diverse are the means used by insects to neutralize substances used by plants for self-protection. In natural plant-insect systems, each of system parts is represented by communities of different organisms. Symbiotic, parasitic and pathogenic organisms are all involved in plant-insect interactions and coevolution. In developing of plant cultivars resistant to pests, it is important to account of possible consequences of the operation of a particular protective mechanism for the entire complex of interactive organisms in an agricultural system, not only for a particular species. Measures that do not accelerate the microevolution of pests are likely to produce more gentle effects of ecosystems. Such measures may include, e.g., those based on the inhibitors of digestive enzymes in insects. Better understanding of the coevolution of plants and insects and of the molecular nature of the adaptation of phytophages to plant-protecting substances is essential for developing pests-resistant cultivars.

Keywords: plant immunity against insects, coevolution of plants and insects, proteinases, α -amylases, inhibitors.

Введение

До трети урожая сельскохозяйственных культур в мире теряется из-за вредных насекомых [1, 12, 107]. Если сюда прибавить потери от болезней, то становятся вполне понятным и обоснованным расходование огромных экономических, энергетических и иных ресурсов на организацию защиты растений от биотических факторов. Чрезмерное применение химических методов борьбы с вредными организмами оказало пагубное воздействие на окружающую среду, что привело к осознанию необходимости повышения роли других подходов, в том числе более широкого использования экологически безопасных природных защитных механизмов растений. Это нашло отражение в популярной в последние годы концепции интегрированной защиты растений, одна из главных целей которой состоит в обеспечении фитосанитарного благополучия территорий при минимальном использовании пестицидов. Наряду с постоянным мониторингом вредных организмов и определением порога их вредоносности, превышение которого требует вмешательства фермера, а также вместе с различными механическими, агротехническими и биологическими приемами борьбы такая защита включает предпочтительное использование сортов сельскохозяйственных культур, устойчивых к вредителям и болезням.

Для стабилизации агроэкосистем без массированного применения химических средств борьбы устойчивые к вредным организмам сорта должны занимать не менее 70–80% посевных площадей, тогда как в нашей стране доля этого важного и безопасного для окружающей среды ресурса повышения урожайности составляет лишь около 10% [1, 12]. В мировой практике есть отдельные примеры эффективного применения устойчивых к вредителям форм в системах защиты растений, позволившие свести к минимуму их химическую составляющую: например, в Юго-Восточной Азии на огромных территориях широко внедряются сорта риса, устойчивые к целому ряду основных вредителей и болезней и отличающиеся высокой толерантностью к различным стрессам [26]. Тем не менее, при наличии определенных успехов в отношении устойчивости к болезням устойчивость к вредителям еще слабо интегрирована в системы защиты большинства сельскохозяйственных культур. Отчасти это связано с недостаточной эффективностью защитных механизмов, применявшихся при создании устойчивых сортов, или с низкой урожайностью устойчивых форм. Очевидно, что решение таких проблем возможно лишь при сотрудничестве специалистов из разных дисциплин. Необходимо сочетание традиционного подхода с его упором на естественные защитные механизмы и нового подхода, включающего достижения современной биологии, основанные на знании важных деталей взаимодействия растений с насекомыми и микроорганизмами.

В настоящее время ставшие уже классическими представления о барьерах иммуногенетической системы растений – атрептическом (деполимеризационном), морфологическом, ингибиторном и других [1, 2] – дополняются и подкрепляются данными биохимии, генетики и молекулярной биологии.

ХИМИЧЕСКАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ ЗАЩИТНЫХ СИСТЕМ РАСТЕНИЙ И МЕХАНИЗМЫ ЕЕ ПРЕОДОЛЕНИЯ НАСЕКОМЫМИ

Растения и насекомые-фитофаги вносят наибольший вклад в биоразнообразие живых немикробных организмов на земле. Имеющиеся сведения указывают на то, что без высокого разнообразия защитных факторов растений не было бы нынешнего видового разнообразия насекомых, по крайней мере, в тропической зоне. В свою очередь, без специализации насекомых не было бы высокого разнообразия растений [22].

Алкалоиды, терпены и другие защитные соединения, выработка которых растениями явилась в значительной мере следствием их коэволюции с насекомыми, оказывают влияние и на других участников биоценозов – млекопитающих, птиц и др., что проявляется в предпочтениях при выборе растительной пищи, возможности усваивать ее, а также сказывается на физиологии и поведении, в том числе у человека (кофеин, теобромин, кокаин, морфин, никотин, каннабиноиды и др.) [57, 64]. Обнаружено сходство эффектов, оказываемых на поведение насекомых и человека некоторыми из указанных соединений.

Понимание сложных механизмов действия и противодействия, выработанных насекомыми и растениями за миллионы лет коэволюции, необходимо для выяснения природы иммунитета растений и создания их устойчивых форм с использованием современных, безопасных для окружающей среды подходов.

Очень важна химическая составляющая защитных систем растений, охватывающая практически все классы вторичных метаболитов, оказывающих прямое токсическое, репеллентное, антипитательное или иное негативное воздействие на фитофагов или, например, привлекающих энтомофагов. Среди них – алкалоиды, цианогенные гликозиды, терпеноиды, глюкозинолаты, макромолекулярные компоненты латекса, вещества белковой природы – лектины, ингибиторы пищеварительных α -амилаз, протеиназ и других гидролаз, а также защитные пептиды. Широкий перечень механизмов их действия – разрушение клеточных мембран, ингибирование транспорта питательных веществ и ионов через мембраны, блокирование процессов передачи сигнала по растению, подавление метаболизма, нарушение гормонального контроля физиологических процессов [86], повышение затрат ресурсов и энергии на усвоение пищи и другие [27].

Механизмы обезвреживания защитных токсинов растений насекомыми включают избегание поглощения токсинов или контакта с ними, выведение их из своего организма и подавление их синтеза в растении [87]. Устойчивость к растительным токсинам включает как метаболические, так и поведенческие реакции. Многие из этих механизмов задействованы в детоксикации как природных метаболитов растений, так и химических инсектицидов, предназначенных для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур. Устойчивость насекомых к некоторым аллелохимическим соединениям может сопровождаться устойчивостью (резистентностью) к инсектицидам с близкой химической природой [36].

Накопленные в последнее время данные о механизмах преодоления указанных защитных барьеров растений насекомыми расширяют представления о фундаментальных аспектах коэволюционной адаптации этих организмов. Значительный вклад в понимание таких механизмов внесли исследования по искусственным пестицидам [56]. Многие токсичные для насекомых соединения из растений (фуранокумарины, госсипол и т. д.) инактивируются при участии ферментов группы цитохромов P450, а УДФ-гликозилтрансферазы переводят разнообразные нежелательные для фитофагов липофильные соединения типа капсаицина перца или бензоксаиноидов кукурузы в водорастворимую форму, более пригодную для выделения из организма или изоляции. Образование аллельных вариантов и дупликация генов, кодирующих указанные ферменты, неравный кроссинговер, повышенная экспрессия и изменение числа копий генов позволяют насекомому приобретать новую или оптимизировать имеющуюся энзиматическую активность и тем самым обеспечивать себе адаптацию к изменяющемуся химическому составу пищи.

Некоторые виды насекомых приобрели способность питаться на видах растений, токсичных для других, благодаря изменениям структуры и функций собственных ферментов, последовавших за дупликацией исходных генов, которые их кодируют [127, 131], или в результате мутаций, приводящих к точечным заменам отдельных аминокислот и делавших данных фитофагов невосприимчивыми к определенным защитным соединениям растений, примером чему могут быть Na/K-АТФазы некоторых бабочек, с одной стороны, и производные сердечных гликозидов (карденолиды) растений, с другой [37]. Возможно предотвращение контакта карденолидов с нервной системой насекомых [98]. Отдельные виды бабочек и прямокрылых даже накапливают в своем теле полученные с пищей карденолиды растений, что делает их ядовитыми для хищников.

Недавно выяснилось, что способность некоторых растительоядных клещей и чешуекрылых успешно

развиваться на растениях, защищенных цианогенными гликозидами, обусловлена ферментами из семейства цистеинсинтаз, приобретенными членистоногими от бактерий в результате горизонтального переноса генов. Фермент, изначально вовлеченный в биосинтез серосодержащих аминокислот у бактерий, обеспечил членистоногим возможность инактивации синильной кислоты, образующейся из гликозидов [132]. Особенности механизмов химической защиты тех или иных видов растений оказывают существенное влияние на состав и структуру связанных с ними сообществ членистоногих фитофагов [99]. Например, генотипы с высоким уровнем химической защиты, специфической для данного семейства растений, дают прибежище преимущественно узкоспециализированным фитофагам, тогда как генотипы с низким содержанием защитных метаболитов привлекают в основном виды с широкой специализацией. Ценой такой адаптации для узкоспециализированных видов фитофагов является потеря способности питаться на других видах растений, составляющих большинство в природных биоценозах. Нередко такие виды используют эти специфические защитные соединения для поиска кормовых растений, тогда как эти же соединения могут отпугивать фитофагов с широкой специализацией.

СИМБИОТИЧЕСКИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ И КОЭВОЛЮЦИЯ НАСЕКОМЫХ И РАСТЕНИЙ

Накопленные за последние годы сведения позволяют внести коррективы в представления о системе «растение-насекомое» как о взаимодействии двух организмов. На самом деле каждая из сторон этой системы состоит из сообществ разнообразных организмов, включая паразитов и симбионтов, так или иначе влияющих на взаимодействие основных компонентов данных сообществ и вовлеченных в их коэволюцию. Бактерии и грибы, живущие в растениях (эндофиты), вносят свой вклад в обеспечение их устойчивости к вредным организмам, а также к другим неблагоприятным воздействиям, в частности, гербицидам [15, 16, 120]. Эндофиты могут непосредственно обезвреживать вредные для растения соединения или запускать в растении механизмы, повышающие его толерантность. Имеющиеся сведения позволяют, с определенной долей условности, рассматривать эндофитные микроорганизмы как один из элементов иммунной системы растений. Например, эндофитные грибы, состоящие в мутуалистических взаимоотношениях с райграсом и другими пастбищными злаками, с помощью нерибосомальной пептидсинтетазы продуцируют перамин. Этот пирролопипразин, являясь сильным пищевым детергентом (агентом, вызывающим отвращение), защищает растения от опасного вре-

дителя – аргентинского долгоносика (*Listronotus bonariensis* Kuschel) [118]. Уже детально охарактеризованы гены эндофитных грибов, ответственные за синтез алкалоидов, которые придают устойчивость кормовым злакам к ряду видов жуков, тлей и чешуекрылых. В Новой Зеландии и Австралии для повышения продуктивности пастбищ успешно используют соответствующие штаммы эндофитов, которые созданы с привлечением новейших биотехнологических методов и у которых в то же время понижено содержание соединений, вредных для млекопитающих [100].

Организмы, ассоциированные с фитофагами, могут модифицировать реакцию растения на нападение последних как непосредственно, вмешиваясь в пути передачи сигнала, подавляя экспрессию генов, связанных с защитой, или меняя вторичный метаболизм растения, так и опосредованно, путем воздействия на поведение и физиологию самого фитофага [137].

Если прежде биохимические адаптации к токсинам растений привязывались исследователями к работе генома насекомого, то сейчас все большее внимание в этой сфере привлекают микробные симбионты, обитающие в кишечнике. Уже находят подтверждение предположение о том, что изменчивость фитофагов по способности питаться растениями, защищенными различными веществами вторичного метаболизма, отчасти определяется изменчивостью ассоциированных с ними микробных сообществ. Данные сообщества могут различаться по способности составляющих их микроорганизмов обезвреживать токсины растений или по устойчивости к антимикробному действию таких токсинов. Множатся подтверждения гипотезы о важной роли микробных сообществ в диверсификации насекомых-фитофагов и коэволюции последних с растениями [54].

В свою очередь, «метаболическая» коэволюция насекомых фитофагов с симбиотическими микроорганизмами существенно расширила набор доступных для них источников пищи. Микроорганизмы, населяющие клетки, кишечник или поверхность тела насекомых, могут обеспечивать последним более эффективное усвоение биополимеров растения и снабжение незаменимыми компонентами пищи, а также обезвреживать токсины, продуцируемые растением [55]. Подавление эндосимбионтов, населяющих пищеварительный тракт насекомых, может быть одним из защитных механизмов растений, причем в этом процессе могут участвовать и эндосимбионты растений [10].

Более сложная ситуация может наблюдаться в случае внутриклеточных симбионтов. Насекомые, питающиеся соками растений (тли, цикадки, белокрылки и другие Hemiptera), содержащими очень ограничен-

ный набор питательных веществ, сумели компенсировать недостаток важнейших компонентов пищи – незаменимых аминокислот, витамина В и т.д. – за счет внутриклеточных симбиотических бактерий, ассоциация с которыми произошла более 100 миллионов лет назад. В результате перераспределения важнейших генов между внутриклеточными симбионтами и насекомыми геномы первых оказались сильно редуцированными, а вторые не ограничились лишь использованием экспрессии генов симбионтов, но также обогатили свой геном за счет горизонтального переноса недостающих или более эффективных генов от экзогенных бактерий [78]. По-видимому, по аналогии с другими микроорганизмами, обитающими в клетках насекомых, например, энтомопатогенными микроспоридиями [5, 124], можно предположить, что внутриклеточные симбионты вредителей, сосущих флоэмный сок, лучше защищены и менее подвержены внешним воздействиям, например, со стороны кормового растения.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАСТЕНИЙ С ЧЛЕНИСТОНОГИМИ ФИТОФАГАМИ

В иммунологии растений еще не сформировались окончательно представления о степени специфичности взаимодействия в системе растение-вредитель и о том, существуют ли здесь взаимодействия типа «ген на ген», как это установлено для системы «растение-патоген». Однако это направление интенсивно развивается. Растет число работ, посвященных выявлению, анализу и картированию генов устойчивости к вредителям. У многих сельскохозяйственных культур уже идентифицированы десятки генов устойчивости к насекомым, а также молекулярных маркеров, облегчающих использование генов устойчивости при создании новых форм растений, например, генов устойчивости пшеницы к вредной черепашке [42]. Идентифицированы и конечные продукты некоторых генов, а также определяемые ими эффекты в отношении вредителей – антибиоз или антиксеноз, и самого растения – толерантность [113]. Интересно, что антибиоз сам по себе или в сочетании с другими эффектами был результатом действия более 90% выявленных генов. Среди немногих известных продуктов конкретных генов устойчивости к насекомым значатся токсичный белок арселин у фасоли, гликоалкалоид лептин у картофеля, а также бензоксизиноид DIMBOA, флавоноид маизин, элементы структуры клеточных стенок и цистеиновая протеиназа у кукурузы. В свою очередь, микросателлитные маркеры могут способствовать селекции, например, фасоли, на устойчивость к повреждающим зерно долгоносикам, основанную на защитных свойствах арселина [25].

Пока лишь немногие гены устойчивости растений к вредителям были секвенированы. Наиболее яркие

примеры – гены Mi-1.2 из томата и Vat из огурца, продукты экспрессии которых, обеспечивающие устойчивость растений к ряду видов насекомых, включая тлей, оказались представителями обширной группы белков, имеющих суперспиральные (coiled coil, CC) нуклеотид-связывающие (nucleotide-binding site, NBS) и богатые повторами лейцина (leucine-repeat rich, LRR) домены и обозначаемых как CC-NBS-LRR-белки. Участие таких белков растений, являющихся продуктами R-генов, в формировании устойчивости к патогенам хорошо изучено [83] и указывает на сходство ряда фундаментальных механизмов иммунитета растений по отношению к насекомым и микроорганизмам. Интересно, что и у млекопитающих есть белки, участвующие в иммунных реакциях и имеющие LRR-домен и домен, обозначаемый как NOD (nucleotide-binding oligomerization domain). Точная роль NBS-LRR-белков у растений до конца не ясна. Известно, что они расположены в цитоплазме или недалеко от клеточной мембраны, и есть основание полагать, что с их помощью отслеживается состояние определенных белков, являющихся мишенями для эффекторов, выделяемых патогенами или фитофагами. При обнаружении изменений в данных белках NBS-LRR-белки запускают каскады нескольких, зачастую взаимодействующих между собой защитных реакций. Однако для большинства известных генов устойчивости растений к насекомым конечные продукты еще не определены.

При всех различиях между взаимодействиями насекомых и микроорганизмов с растениями (достаточно упомянуть сложнейшие поведенческие реакции насекомых или важную роль эндосимбионтов в пищеварении) постепенно формируется представление о том, что защитные реакции растений на нападение вредителей и патогенов во многом сходны на молекулярном уровне передачи сигнала и запуска ответных реакций. Много внимания уделяется факторам, вызывающим ответную реакцию. Если для патогенов этот вопрос уже во многом прояснен [14, 96, 121], то понимание таких механизмов у насекомых только формируется. Отправным пунктом является повреждение растения насекомыми при питании, однако разные вредители (например, чешуекрылые, трипсы или тли) повреждают ткани неодинаково, соответственно неодинаковы и формирующиеся сигнальные соединения. Помимо молекулярных фрагментов тех или иных поврежденных клеточных структур растения, ассоциированных с повреждением, – олигосахаридов, пептидов и др., – обозначаемых в зарубежной литературе как DAMPs (damage-associated molecular patterns) по аналогии с PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), которые сами по себе являются сигналами к запуску защитных реакций, источниками сигналов могут быть и компоненты секретов

слиюнных желез, продукты частично переваренного растительного материала из верхних отделов пищеварительного тракта, секреты, выделяемые при откладке яиц, и другие продукты жизнедеятельности растительноядных насекомых, обозначаемые как HAMPs (herbivore associated molecular patterns), или их «молекулярные образы». Состав «молекулярных образов» вредителей и способность растений распознавать их определяются особенностями систем «растение-фитофаг» [17]. Однако, хотя уже накоплено немало сведений относительно разнообразных стимуляторов и эффекторов, производимых членистоногими фитофагами, воспринимающие их рецепторы у растений остаются еще слабо изученными.

После восприятия сигналов растение запускает механизмы прямой и непрямой защиты посредством действия гормонов – жасмоновой кислоты, этилена, салициловой кислоты, а также образования активных форм кислорода и так далее. При этом могут запускаться и гормональные механизмы, повышающие выносливость растений.

Считается, что жасмоновая кислота управляет защитными механизмами против преимущественно грызущих насекомых и некротрофных патогенов, а салициловая – против биотрофных патогенов и таких сосущих вредителей, как тли. Гормональные системы могут взаимодействовать в антагонистической или синергетической манере, а фитофаги – как микроорганизмы, так и насекомые – могут встраиваться в это взаимодействие для своей выгоды с помощью эффекторов [32, 67]. Например, продукты жизнедеятельности гусениц кукурузной совки *Spodoptera frugiperda* вначале инициируют накопление в листьях кукурузы жасмоновой кислоты, запускающей каскад защитных реакций против фитофагов, однако затем происходит стимулирование накопления салициловой кислоты, что, с одной стороны, активирует защиту против фитопатогенных микроорганизмов, а с другой – подавляет функционирование жасмонатного пути. В итоге создаются условия, благоприятные для развития гусениц [104]. Возможны и другие, более опосредованные варианты проявления действия сигнальных систем растения. Так, один из штаммов эндофитной бактерии *B. subtilis* стимулирует синтез ингибиторов протеиназ у картофеля, что, помимо прямого воздействия на пищеварительные ферменты колорадского жука [10], теоретически может также угнетать эндосимбиотические микроорганизмы в его кишечнике и тем самым еще более затруднять усвоение пищи вредителем.

В качестве конечных продуктов защитных реакций синтезируются факторы прямой защиты – ингибиторы протеиназ, защитные пептиды, алкалоиды и другие соединения, обеспечивающие как антибиоз, так и антиксеноз (такое влияние растения на фитофага,

которое заставляет его переключаться на другой вид растений), а также ряд летучих соединений непрямого действия, привлекающих энтомофагов и паразитов или препятствующих выбору растения для откладки яиц [65]. Кроме того, в ответ на нападение фитофага растение может активировать физиологические процессы, позволяющие снизить потери, и облегчить прохождение неблагоприятного периода (повысить выносливость), например, за счет связывания сахаров в подземных запасующих органах [110]. Совместное действие факторов прямой и непрямой защиты обеспечивает устойчивость к широкому кругу членистоногих фитофагов в природных экосистемах [58].

Индукцированный иммунитет в определенных случаях может быть энергетически более выгодным для растения, поскольку ресурсы затрачиваются лишь в случае нападения. Однако скорость реакции может оказаться недостаточной. В репродуктивных и запасующих органах наибольшую роль все же играют механизмы конституционального иммунитета. В конечном счете коммерческий успех того или иного устойчивого сорта во многом определяется энергетической ценой задействованных в нем защитных механизмов. Если она чрезмерна, продуктивность окажется низкой [116].

Для того чтобы избежать ненужных расходов ресурсов, растения должны отличать повреждения, вызванные фитофагами, от результатов воздействия ветра, осадков и других внешних факторов. Многие гены, определяющие работу защитных механизмов, могут активироваться как вредителями, так и простым повреждением, однако выработка токсичных метаболитов может принести растению пользу лишь в отношении первых [58]. Использование ДНК-микрочипов позволило выявить гены, которые специфически активировались только при питании насекомых, в частности, выделениями из их пищеварительных органов, что приводило, например, к синтезу никотина [59] или гликозинолатов [85].

Хотя далеко не все стимуляторы защитных реакций растений (элиситоры) пока еще идентифицированы у тлей и других Hemiptera, питающихся флоэмным соком (есть данные, что это могут быть ферменты слюнных желез [138]), защитные реакции растений против таких фитофагов, запускаемые NBS-LRR-белками, которые контролируются R-генами, отличаются от реакций на механическое повреждение. Эту ситуацию можно рассматривать как взаимодействие типа «ген на ген».

По-видимому, для отдельных видов растений и их вредителей относительная роль механизмов конституционального и индуцированного иммунитета может быть неодинаковой. Были проведены эксперименты по избирательному подавлению экспрессии генов, связанных с конституциональной или индуцирован-

ной устойчивостью к вредителям [66, 123], которые подтвердили важную роль обеих форм иммунитета. Уже известны примеры создания экспериментальных форм растений, устойчивых к вредителям, на основе генов, чья экспрессия индуцируется повреждением. Однако следует отметить, что реальные, практически значимые достижения в конструировании сортов, устойчивых к вредителям, достигнуты пока в первую очередь с использованием механизмов конституционального иммунитета, определяющих признаки, не меняющиеся в зависимости от условий.

В последнее время все больше внимания уделяется еще одному относительно недавно открытому фундаментальному молекулярному механизму, который имеет отношение как к регуляции экспрессии генов, так и к внутриклеточному иммунитету практически у всех организмов. Речь идет о РНК-интерференции – механизме подавления экспрессии гена под действием коротких, в том числе двухцепочечных РНК, имеющих участки, комплементарные этому гену или соответствующей информационной РНК [47]. К комплексу интерферирующей и информационной РНК присоединяются клеточные белки, вызывающие разрушение информационной РНК и прекращение трансляции – то есть ген замолкает. По-видимому, исходно этот универсальный для животных и растений механизм был направлен на борьбу с вирусами и другими генетическими паразитами – транспозонами. Интенсивно разрабатываются подходы к его использованию для решения различных задач медицины и биотехнологии, в частности, растений, для перенаправления метаболизма растения с целью снизить или, наоборот, повысить накопление нежелательных или полезных веществ [13]. Применение РНК-интерференции открывает широкие перспективы и для защиты растений от вредителей. Стало возможным отключать определенный ген или комплекс генов у насекомого, что может в итоге либо просто погубить его, либо снизить возможности адаптации к составу корма [34]. Человек фактически только корректирует эту регуляцию. Этот подход может быть применен как посредством генетически модифицированных растений, так и в форме опрыскивания.

ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ: КРИТЕРИИ ИХ ВЫБОРА ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ УСТОЙЧИВЫХ ФОРМ РАСТЕНИЙ

При конструировании форм растений, устойчивых к вредителям, очень важно учитывать возможные последствия использования того или иного защитного механизма не только в отношении отдельных особей, но также популяций вредителей и агроэкосистемы в целом. В сильно упрощенном виде такие факторы можно подразделить на две группы [3].

1. Ограничивающие питание факторы, такие как доступность компонентов пищи для насекомого, низкая подверженность белков и углеводов действию его пищеварительных ферментов, ингибирование пищеварительных ферментов, разрушение незаменимых компонентов пищи, факторы, препятствующие поеданию растения насекомым (антифиданты), и т. п., обеспечивают ослабление насекомых и усиление их подверженности действию других защитных факторов, а также снижение их численности и вредоносности (синдром «неполного голодания» [1, 2]) при сохранении структуры популяции.

2. Токсические факторы, в том числе и Vt-токсины, обеспечивающие высокую летальность вредителей, стимулируют ускоренную микроэволюцию со сдвигом структуры популяции в пользу резистентных форм, что со временем приводит к снижению эффективности данных защитных факторов.

Таким образом, действие механизмов, приводящих к неполному голоданию, является более мягким и щадящим по отношению к экосистеме и может быть предпочтительным.

В практическом отношении результаты применения методов биотехнологии наиболее заметны на примере Vt-токсинов – токсичных для насекомых белков микробного происхождения. Известно более 100 вариантов Vt-токсинов, отличающихся по эффективности действия на разных насекомых, что позволяет целенаправленно создавать формы растений, устойчивые к определенным вредителям. Однако у этого подхода есть и негативные стороны [117]. Vt-токсины при всем их разнообразии не эффективны по отношению к целым группам важных вредителей, например, полужесткокрылым, и их применение рано или поздно приводит к появлению резистентных форм вредителей. Среди возможных решений – одновременное использование генов более чем одного варианта Vt-токсина (стратегия пирамид), которая, однако, оказалась не всегда эффективной, особенно в случае близкого расположения посевов растений с одним и двумя вариантами гена Vt-токсина. Другие подходы включают использование генов Vt-токсинов в сочетании с генами иных защитных белков, что теоретически должно замедлять появление резистентности, а также расширение набора токсичных белков и всего арсенала методических подходов. Так, при создании форм кукурузы, устойчивых к жуку *Diabrotica*, предлагается использовать токсичный для данного вредителя белок из бактерии рода *Pseudomonas*, механизм действия которого на насекомое совершенно отличен от такового у Vt-токсина [108]. Такой подход выглядит многообещающим, поскольку данный белок не действует в полевых условиях на чешуекрылых и полужесткокрылых, зато убивает личинки *Diabrotica*, в том числе резистентные к Vt-токсину. Другой подход, разраба-

тываемый этим же коллективом, основан на использовании методов РНК-интерференции для подавления трансляции ключевых для вредителя генов.

В целом, перечень естественных для растений белков с активностью, направленной против насекомых-фитофагов, и представляющих интерес при конструировании устойчивых к вредителям форм растений довольно широк: лектины; белки, инактивирующие рибосомы (RIP); защитные пептиды дефензины и циклотиды; ферменты уреазы, хитиназы и пептидазы, а также ингибиторы пищеварительных ферментов [53]. Основной стратегией применения таких белков является перенос кодирующих их генов в растения, где они исходно отсутствуют, и, соответственно, зависящие от данных растений фитофаги никогда ранее с такими белками не взаимодействовали.

Лектины – белки растений, высокоспецифичные к разнообразным углеводам или гликоконъюгатам (углеводам, ковалентно связанным с белками, липидами или другими молекулами), присутствующим в вирусах, бактериях, грибах, беспозвоночных (включая насекомых-фитофагов) и других потенциально опасных для растений организмах. Действие многих лектинов на насекомых осуществляется через пищеварительную систему. Их мишенями являются встроенные в мембраны клеток эпителия или секретруемые в полость кишечника ферменты и транспортные белки, содержащие в своей структуре гликаны; в число таких белков входят аминопептидазы, α -амилазы, ферритин и многие другие гликопротеины. Один из механизмов действия лектинов состоит в образовании крупных агрегатов из молекул гликопротеинов, которые не способны проникать через перитрофическую мембрану, что делает невозможной обратную диффузию ферментов насекомого для рециклизации в пищеварительной системе [122]. С другой стороны, специфичные к хитину лектины могут повреждать перитрофическую мембрану, что приводит к нарушению баланса между экто- и эндоперитрофическими зонами кишечника, а также, индуцируя апоптоз клеток эпителия кишечника, снижать содержание вырабатываемых ими пищеварительных ферментов [35]. В отношении насекомых, лишенных перитрофической мембраны в кишечнике, например тлей, более действенны другие механизмы активности лектинов.

При создании растений, устойчивых к тлям и другим фитофагам, сосущим флоэмный сок, необходимо учитывать особенности их питания и биологии, а также невосприимчивость многих из них к Vt-токсинам. И здесь на первый план выходят лектины, хотя ширятся попытки использовать и другие защитные факторы. Известно, что флоэмный сок может содержать лектины, ингибиторы протеиназы и другие белки. К настоящему времени уже получены трансгенные растения с 13 генами, принадлежащими к 7 семей-

ствам лектинов [136]. К сожалению, помимо инсектицидного или фунгицидного действия, некоторые из использованных лектинов могут проявлять множество других видов биологической активности, включая токсичность или способность активировать или подавлять деление клеток. Это может иметь негативные последствия для полезных организмов и человека и делает необходимым особенно тщательно анализировать побочные эффекты от всех подобных белков. Разрабатываются также подходы, основанные на известных R-генах устойчивости к тлям, на целенаправленном изменении метаболизма терпенов и других метаболитов растений, на механизмах РНК-интерференции и т. д.

Разработаны биопестициды нового типа, представляющие собой химерные белки, которые могут быть использованы для борьбы с вредителями, сосущими флоэмный сок. Так, на растениях арабидопсиса, экспрессирующих в листьях ген, кодирующий гибридный белок, состоящий из токсина паука и лектина подснежника, наблюдалась повышенная смертность большой злаковой (*Sitobion avenae*) и персиковой (*Myzus persicae*) тлей [88]. Конечно, и эти решения не могут служить панацеей, а должны находиться в обширном ряду различных подходов.

ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ НАСЕКОМЫХ И ИХ БЕЛКОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ КАК ЭЛЕМЕНТЫ КОЭВОЛЮЦИИ НАСЕКОМЫХ И РАСТЕНИЙ

Среди защитных механизмов растений, относительно безопасных для человека и природных экосистем, на которые можно было бы опереться при конструировании растений, устойчивых к вредителям, выделяются, в частности, действующие посредством белковых ингибиторов пищеварительных ферментов насекомых. На примере таких ингибиторов можно осветить некоторые проблемы, возникающие при создании форм растений, устойчивых к вредителям, методами биотехнологии.

Протеиназы, α -амилазы и другие пищеварительные гидролазы играют ключевую роль в пищевых связях насекомых с растениями. От того, насколько эффективно эти ферменты гидролизуют белки и углеводы растений, во многом зависит жизнеспособность фитофагов. Ингибиторы помогают растению затруднять этот процесс. Шансы растения на выживание существенно повышаются при наличии любых факторов, снижающих доступность незаменимых аминокислот или энергетических ресурсов для фитофагов. Ингибиторы входят в число подобных факторов [62].

Системы белковых ингибиторов α -амилаз, протеиназ, пектиназ и других гидролаз у растений очень сложны, многообразны [21, 48, 135] и являются важ-

ными компонентами как конституционального, так и индуцированного иммунитета к вредным организмам. Многообразие и сложность наборов ингибиторов экзогенных протеиназ и других гидролаз формировались в ходе коэволюции растений и фитофагов, в первую очередь, насекомых [8, 62, 68].

Протеиназы насекомых и их ингибиторы у растений

Протеиназы насекомых, обеспечивающие усвоение ими белков пищи, представлены сериновыми, цистеиновыми, аспартильными и металлсодержащими ферментами, отличающимися по структуре активных центров, взаимодействующих с субстратами [80, 119]. Участие цистеиновых ферментов в пищеварении является существенным отличием насекомых и ряда других беспозвоночных от млекопитающих и других позвоночных: у первых часть цистеиновых протеиназ из внутриклеточных превратились в секретируемые внеклеточные, что существенно повысило эффективность всего протеолитического комплекса [90]. Соответственно и роль факторов, ограничивающих активность тех или иных ферментов, неодинакова в отношении насекомых и млекопитающих: наличие ингибиторов цистеиновых протеиназ в пище существенно, в первую очередь, для насекомых. Последнее обстоятельство делает особенно привлекательной идею создавать устойчивые к насекомым растения при использовании факторов, нейтральных для человека и сельскохозяйственных животных. Среди ингибиторов α -амилаз (см. ниже) также есть формы, специфичные преимущественно к ферментам насекомых [48, 68, 74].

Ингибиторы протеиназ – естественные для растений белки. Они, как правило, безвредны для человека, а иногда даже полезны вследствие антиканцерогенной и антивирусной активности, например, ингибиторы протеиназ семейства Bowman-Birk [31]. Интересно, что ингибиторы протеиназ способны подавлять развитие даже таких насекомых, как тли, у которых, как было принято считать, белковое питание отсутствует. Недавно протеиназы, способные расщеплять белки растений, были все же найдены в пищеварительной системе тлей [50, 136]. Известны также примеры негативного воздействия ингибиторов протеиназ на тлей. Однако в ряде случаев защитный эффект может быть результатом действия ингибиторов не на пищеварительные протеиназы, а, например, на участвующие в метаморфозе насекомых.

Набор и специфичность пищеварительных протеиназ фитофага во многом определяются конкретным источником пищи. Это можно, отчасти, проследить на примере трипсино- и химотрипсиноподобных сериновых протеиназ, принадлежащих к семейству S1. Сериновые ферменты, подобные стандартным для ис-

следователей трипсину или химотрипсину млекопитающих, синтезируются в пищеварительных органах большинства видов насекомых; однако на базе единой, но эволюционно гибкой молекулярной структуры возникли варианты, приспособленные к гидролизу самых разнообразных субстратов. Так, трипсин быка гидролизует пептидные связи по лизину или аргинину с карбоксильной стороны, а химотрипсин – по любой из ароматических аминокислот. В свою очередь, одна из форм протеиназ (GHP3), вырабатываемых в слюнных железах клопа вредная черепашка *Eurygaster integriceps* Put. (Scutelleridae) [72], проявляет заметное сходство последовательности с трипсином, но в наибольшей степени (от 35 до 42% гомологии) она близка сериновым трипсиноподобным протеиназам насекомых, синтезируемым в слюнных железах других видов клопов – растительноядных из семейства Miridae и кровососущих из семейства Reduviidae. Протеиназы клопов рода *Lygus* Hahn (Miridae) гидролизуют те же субстраты, что и стандартный трипсин быка, тогда как трипсиноподобные (по структуре) протеиназы переносчика болезней *Triatoma infestans* (Klug) особенно специфичны к белкам крови, а протеиназа черепашки GHP3 – к субъединицам запасного белка зерна пшеницы – глютеина. Негомологичные участки последовательностей протеиназ, по-видимому, в какой-то мере ответственны за тонкие различия в пространственной структуре и специфичности ферментов, которые могут быть выявлены физическими методами (рентгеноструктурный анализ) или компьютерным моделированием на основании известных аминокислотных последовательностей [72]. Структура активного центра протеиназы GHP3 явно соответствует структуре повторяющегося элемента последовательности глютеина, который она разрезает по границе между гекса- и нонапептидами. У другого вредителя пшеницы, клопа *Nysius huttoni* White (Lygaeidae), коэволюция с кормовыми растениями привела к появлению варианта сериновой протеиназы, гидролизующей высокомолекулярный глютеин по середине гексапептидов [43].

Растения, со своей стороны, отвечают на модификации структуры пищеварительных ферментов фитофагов изменением структуры своих белков. Так, показано, что устойчивость клейковины к протеиназам клопов рода *Eurygaster* Lap., а также полевая устойчивость сортов пшеницы к данным вредителям могут коррелировать с компонентным составом весьма гетерогенных и изменчивых высокомолекулярных субъединиц глютеина [45, 130]. Другой механизм ограничения действия пищеварительных гидролаз фитофагов связан с чрезвычайно разнообразными белковыми ингибиторами – как конституциональными, накапливаемыми в семенах, клубнях и репродуктивных органах растений одновременно с запасными

веществами, так и индуцируемыми, синтез которых, например в листьях, запускается воздействием насекомых или патогенов. Ингибитор, связываясь своим доменом, имитирующим субстрат, с активным центром протеиназы, блокирует его. В результате фермент теряет активность, что затрудняет усвоение белков фитофагом, увеличивает его энергетические затраты на усвоение пищи и снижает жизнеспособность. Кроме того, присутствие ингибиторов стимулирует усиленный синтез пищеварительных протеиназ, что приводит к истощению ресурсов энергии, а также серосодержащих аминокислот в организме вредителя.

В международной базе данных по пептидазам и их ингибиторам MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) выделяются более 80 семейств белковых ингибиторов, представители которых найдены в разных группах живых организмов. У растений найдены представители от 10 до 13 семейств ингибиторов протеиназ, в том числе несколько семейств ингибиторов сериновых, цистеиновых, аспартильных протеиназ, а также ингибиторов металлокарбоксипептидаз [11, 21, 126] (все упомянутые ферменты-мишени ингибиторов характерны для пищеварительной системы насекомых). Ингибиторы протеиназ у растений представлены разнообразными пептидами и белками с молекулярной массой от 1,5 кДа (SFTI-1 у подсолнечника) [79] до нескольких десятков кДа [21, 126]. Наиболее изучены представители семейств ингибиторов протеиназ Bowman-Birk (найжены у бобовых и злаков), Kunitz (у большинства цветковых и голосеменных [75]), ингибиторов типа I и II из картофеля (они есть только у пасленовых), ингибиторов α -амилаз/трипсина из семян злаков, ингибитора трипсина из семян тыквенных, ингибитора трипсина из семян горчицы (найжены только у крестоцветных), ингибитора трипсина из семян вероники (семейство I73 по номенклатуре MEROPS) или α -гарпининов [33, 91], серпинов и фитостатинамов, ингибитора аспартильных протеиназ (родственны ингибиторам из семейства Kunitz). Большинство ингибиторов содержат в своей структуре домен, который называют «реактивный центр», – это полипептидная имитирующая природный белковый субстрат петля, которая связывается с активным центром протеиназы, но, в отличие от субстрата, не отсоединяется от него сразу после гидролиза пептидной связи, соответствующей специфичности фермента, что делает невозможным дальнейшее функционирование последнего. Такой механизм характерен для наиболее распространенных растительных ингибиторов пищеварительных протеиназ насекомых и других фитофагов. Иной механизм используется серпинами – единственным типом ингибиторов, представители которого найдены у всех основных групп организмов – от эукариот до вирусов. Реактивный центр серпинов также имитирует нормальный субстрат, но

взаимодействие с протеиназой приводит к резкой смене конформации ингибитора, сопровождающейся необратимым нарушением структуры активного центра фермента. Поскольку последствия такого взаимодействия необратимы и для ингибитора, этот механизм называют «суицидальным». Интересно, что реактивные центры серпинов, найденных в зернах пшеницы и ржи, содержат последовательности, состоящие из нескольких остатков глутамин подряд. Это расценивается как имитация первичной структуры запасных белков проламинов и позволяет предположить функциональную направленность данных серпинов на подавление протеиназ вредных насекомых [94].

Начиная с 1996 г., гены разнообразных ингибиторов протеиназ встраивают в геномы многих растений для придания им устойчивости к вредителям и болезням [11, 39, 51, 53, 60, 111].

α-Амилазы и их ингибиторы

α-Амилазы играют важнейшую роль в усвоении насекомыми крахмала – основного источника энергии для многих видов фитофагов [48]. Как и протеиназы, α-амилазы синтезируются как в кишечнике, так и в слюнных железах насекомых, причем зачастую эти формы существенно различаются по свойствам и чувствительности к ингибиторам [68, 74].

Необходимость защиты запасных углеводов от фитофагов привела к появлению у растений нескольких эволюционно независимых молекулярных механизмов подавления чужеродных амилолитических ферментов. Одни из них возникли на основе структур белков, функционально связанных с углеводами, например, лектинов. Другие являются представителями обширных семейств белков с разнообразными, но преимущественно защитными функциями, например, тауматин- или тионин-подобных белков. Некоторые ингибиторы α-амилаз объединены в одну молекулярную структуру с ингибиторами протеиназ или гидролазами (например, хитиназой), что существенно увеличивает их защитный потенциал [48].

По-видимому, ингибиторы амилаз насекомых и других фитофагов и ингибиторы эндогенных α-амилаз (ответственных за регуляцию ферментов растения) эволюционировали независимо и не проявляют перекрестной активности, тогда как отдельные системы ингибиторов протеиназ могут взаимодействовать как с чужеродными, так и эндогенными ферментами (например, ингибиторы цистеиновых протеиназ у злаков). Состав систем ингибиторов чужеродных α-амилаз и протеиназ может отражать сортовую и видовую специфику, эволюцию и филогению растений, а также полиплоидную природу видов, например, пшеницы [8, 68], или вигны [76]. Наиболее хорошо изучены ингибиторы α-амилаз из семян злаков и бобовых.

По молекулярной структуре ингибиторы α-амилаз у растений можно подразделить на несколько классов: лектин-подобные, кноттин-подобные (knottin-like), семейство ингибиторов из семян злаков, подобные ингибитору протеиназ Кунитца, γ-пурутионин-подобные и тауматин-подобные [105].

Отдельные изоформы лектин-подобных ингибиторов из семян фасоли отличаются по отношению к α-амилазам млекопитающих и разных видов насекомых [52, 76]. Эти белки очень похожи на фитогемагглютинины, а некоторые их изоформы, весьма близкие к ним по структуре, будучи токсичными для насекомых, но лишены способности ингибировать α-амилазы, могут рассматриваться как переходные звенья между агглютинидами, арселинами и ингибиторами α-амилаз насекомых [129]. Один из родственных указанным белкам представителей этого семейства является специфичным ингибитором α-амилаз грибов и одновременно обладает гемагглютинирующей активностью [44].

Кноттин-подобный высокоспецифичный ингибитор α-амилаз насекомых из семян амаранта, самый низкомолекулярный из известных у растений ингибитор α-амилаз (всего 32 аминокислотных остатка), близок по структуре представителям семейства ингибиторов трипсина из тыквы, а также токсинам ряда беспозвоночных [97].

Ингибиторы чужеродных α-амилаз из семян злаков, являясь представителями особого семейства ингибиторов, отличаются по способности образовывать мультмерные комплексы (размер мономера около 12 кДа), а также по активности к ферментам насекомых. Состав ингибиторов α-амилаз насекомых и млекопитающих у полиплоидных видов пшеницы отражает их геномную структуру и эволюционные связи с их дикими сородичами – эгилопсами [8, 68]. Возрастание уровня плоидности, в целом, сопровождалось усложнением состава ингибиторов α-амилаз насекомых. Возможно, это было обусловлено необходимостью компенсировать повышение пищевого качества зерна современных культурных полиплоидных пшениц, увеличившее его привлекательность и для насекомых, питающихся зерном. Состав отдельных ингибиторов α-амилаз насекомых весьма изменчив в пределах рода, видов, популяций и даже сортов. Эта изменчивость коррелирует и с уровнем ингибирующей активности, что может выражаться, в частности, в отличиях сортов пшеницы по устойчивости к зерновым вредителям. Некоторые диплоидные виды пшеницы (все известные генотипы культурной *Triticum monococcum* и большинство генотипов дикой *T. boeoticum*) лишены ингибиторов α-амилаз насекомых [6, 8]. Возможно, что длительное отсутствие угрозы со стороны соответствующих вредителей может служить причиной перехода некоторых генов ингибиторов α-амилаз в «молчащее» состояние [106].

Ингибиторы, относящиеся к данной группе, могут быть бифункциональными, например, помимо α -амилаз насекомых могут ингибировать и трипсиноподобные протеиназы тех же насекомых, а также млекопитающих и грибов [48, 74].

Представители семейства протеаз Кунитца представлены бифункциональными ингибиторами α -амилаз прорастающего зерна злаков и микробных субтилизин-подобных протеиназ. Активность к α -амилазам насекомых они не проявляют [7, 74], однако, в принципе, они могут влиять на фитофагов, подавляя активность субтилизин-подобных протеиназ эндосимбиотических микроорганизмов, обитающих в их кишечнике. Ингибиторы протеиназ, также содержащиеся в растениях, в частности, цистатины, могут предохранять ингибиторы α -амилаз от протеолиза и тем самым усиливать их защитную функцию [19].

Гены ингибиторов α -амилаз, наряду с генами ингибиторов протеиназ, а также сцепленные с ними генетические маркеры используются при конструировании форм растений, устойчивых к вредителям [25, 48, 63, 84, 109].

Пектиназы и их ингибиторы

Пектиназы (в том числе полигалактуроназы) – ферменты, осуществляющие гидролиз пектина, важного компонента клеточных стенок у растений. В основном пектиназы синтезируются микроорганизмами и растениями. У насекомых пектиназы продуцируются главным образом симбиотическими микроорганизмами, хотя известны примеры пектиназ, синтезируемых самим насекомым, например, слюнными железами клопа *Lygus hesperus* Knight) [28]. Однако уже на нескольких примерах доказано бактериальное происхождение генов пектиназ, присутствующих в геноме некоторых видов насекомых, что является следствием горизонтального переноса генов [112]. Интересно, что полигалактуроназы тлей, распространяемые по флоэме, индуцируют защитные реакции растения, в частности, накопление перекиси водорода во флоэмном соке, что негативно действует на пищеварительную систему вредителей [138].

Ингибиторы полигалактуроназ принадлежат к семейству лейцин-богатых (LRR) белков и в основном направлены на предотвращение проникновения патогенных грибов в растительные клетки за счет подавления активности ферментов, разрушающих полисахаридную основу клеточных стенок [82]. Повышение содержания олигосахаридов в клетке за счет гидролиза полисахаридов (пектинов) клеточной стенки, образованных остатками галактуроновой кислоты, служит сигналом для синтеза ингибиторов полигалактуроназ. Помимо эндополигалактуроназ грибов эти ингибиторы действуют также на ферменты бактерий и насекомых, в частности, растительоядных

клопов [49]. В растениях выявлен механизм, дифференцирующий запуск синтеза отдельных вариантов ингибиторов, действующих на отношении грибов и насекомых [38]. Уже созданы трансгенные растения, устойчивость которых к грибным патогенам определяется ингибиторами полигалактуроназ [46, 101], что указывает на возможность использовать аналогичные подходы и в отношении других вредителей.

Адаптация насекомых к белковым ингибиторам и пути ее ограничения

Ингибиторы в качестве защитных факторов обладают, наряду с несомненными достоинствами, также и рядом недостатков; например, многие вредители способны преодолевать этот барьер. Насекомые-фитофаги на протяжении сотен миллионов лет взаимодействовали с белковыми ингибиторами их пищеварительных ферментов, содержащимися в растениях, что в результате коэволюции привело к формированию разнообразных и весьма изощренных механизмов адаптации. Установлено, что наличие ингибиторов в пище провоцирует запуск множества компенсаторных процессов. Так, например, с помощью технологии ДНК-микрочипов установлено, что в ответ на появление ингибиторов протеиназ в пище в тканях кишечника саранчи усиливается транскрипция более сотни генов, а транскрипция еще большего числа генов ослабевает [114]. В числе новых транскриптов есть и те, что соответствуют пищеварительным протеиназам. Важно, что подобные сведения по составу транскриптома кишечника могут представлять интерес и в связи с технологией РНК-интерференции, поскольку позволяют очень точно подобрать мишень для воздействия на насекомое.

Адаптация насекомых к белковым ингибиторам протеиназ может происходить путем усиления экспрессии генов пищеварительных протеиназ, синтеза протеиназ, нечувствительных к ингибиторам, синтеза протеиназ, гидролизующих ингибиторы [138], а также путем блокирования синтеза защитных белков в растении, что включает способность насекомого выделять соединения, дезориентирующие сигнальную систему растений [67]. Усиление экспрессии генов пищеварительных протеиназ может привести к истощению резервов незаменимых аминокислот, а также важных для синтеза протеиназ серосодержащих аминокислот. Синтез нечувствительных к ингибиторам протеиназ также запускается при снижении концентрации активных ферментов, вызванном действием ингибиторов. Этот процесс управляется особыми контролирующими пептидами, присутствующими в полости кишечника [62]. Нечувствительные протеиназы могут отличаться от чувствительных незначительными структурными изменениями, влияющими

на связывание с ингибитором, или принадлежать к совершенно другим семействам протеиназ. Протеиназы, гидролизующие и инактивирующие ингибиторы, могут быть специфичными к ингибиторам основного кормового растения и не действовать на ингибиторы из других видов растений, как, например, у капустной моли *Plutella xylostella* [134], или принадлежать к классу протеиназ, не соответствующему спектру действия ингибитора [18]. Интересно, что ингибиторы протеиназ и нечувствительные к ним протеиназы насекомых могут участвовать в формировании сложных, в том числе мутуалистических взаимоотношений растений и насекомых. Так, мирмекофитные виды акации продуцируют пищевые тельца, содержащие белки для питания муравьев рода *Pseudomyrmex*, с которыми они находятся в отношениях облигатного мутуализма. Тельца содержат также несколько вариантов ингибиторов протеиназ семейства Кунитца, которые подавляют протеиназы некоторых видов жуков, но не муравьев рода *Pseudomyrmex*. То есть ингибиторы предохраняют пищевые тельца от поедания неадаптированными фитофагами и тем самым предоставляют преимущество насекомым-симбионтам [93].

Известно, что эффект большинства соединений, используемых при создании устойчивых форм растений, рано или поздно компенсируется адаптацией насекомых. Более перспективным считается сочетание нескольких разнородных защитных факторов или механизмов в растении, что должно ограничивать или замедлять процесс адаптации насекомых. Наиболее эффективным признано использовать гены тех вариантов ингибиторов, с которыми вредитель раньше не взаимодействовал; например, в хлопок вводят гены ингибиторов трипсина из бобовых или злаков или даже из животных. Потенциал ингибиторов существенно возрастает, когда одновременно используют гены ингибиторов протеиназ и, например, Vt-токсина. Это уже нашло применение на хлопке, причем пока без провоцирования микроэволюционных процессов у вредителей и, соответственно, без приобретения ими резистентности [51].

Интересный эффект получается при сочетании ингибиторов с веществами вторичного происхождения. Так, на табаке с привлечением методов РНК-интерференции, позволяющих выключать синтез ингибиторов протеиназ или никотина, было показано, что ингибиторы в сочетании с никотином проявляют мощный защитный синергизм в отношении совки малой *Spodoptera exigua*, тогда как на растении с ингибитором, лишенном никотина, фитофаг развивается даже лучше, чем на растении и без ингибитора, и без никотина. В данном случае имеет место мощная компенсаторная реакция насекомого на ингибитор, которая выражается в активации пищеварительных ферментов и приводит к большому ущербу

для растения. Никотин, в свою очередь, обеспечивает эффективность данной пары за счет блокирования компенсаторных реакций насекомого [115]. Современные методы, в принципе, уже позволяют управлять содержанием веществ вторичного происхождения в различных органах, что делает такие подходы пригодными и для получения растений, подходящих для питания человека или животных. Например, уже созданы растения хлопчатника без госсипола в семенах, но содержащие этот полифенол в вегетативных частях и сохранившие устойчивость к насекомым [95].

Может быть эффективным сочетание ингибиторов двух и более типов, например, ингибиторов сериновых и цистеиновых протеиназ [92], ингибиторов протеиназ и α -амилаз, или ингибиторов и других защитных белков. Совместное действие ингибиторов цистеиновых протеиназ, например, из сои, с ингибитором α -амилаз из пшеницы способно обеспечить растениям синергетический защитный эффект в отношении жуков-зерновок. Роль ингибитора протеиназ в этой паре заключается в подавлении цистеиновых пищеварительных протеиназ насекомых, способных разрушать токсичный для многих насекомых ингибитор α -амилаз [19]. Сочетание ингибиторов протеиназ с лектинами способно обеспечить устойчивость к полужесткокрылым, цикадкам и тлям. Методы РНК-интерференции также можно использовать для подавления индуцированного ингибиторами синтеза нечувствительных к данным ингибиторам протеиназ, причем этот метод позволяет подавить экспрессию целого набора генов, причастных к адаптации насекомых, за счет инактивации факторов транскрипции.

Проблема ограничения нежелательной активности протеиназ является важной задачей не только для сельского хозяйства, но и для медицины, где интенсивно разрабатываются соответствующие молекулярно-генетические подходы, с помощью которых уже достигнуты существенные успехи в терапии тромбозов, а также вирусных и онкологических заболеваний. Эти подходы представляют интерес и для решения проблем защиты растений.

Среди возможных путей снижения нежелательной активности протеиназ можно отметить следующие: использование известных белковых ингибиторов из растений или животных или конструирование на их основе новых специфичных ингибиторов конкретных протеиназ; создание специфичных ингибиторов на основе пропептидов протеиназ – аминокислотных последовательностей, в норме блокирующих активный центр протеиназы при ее биосинтезе; использование ингибиторов, созданных на основе антител к активному центру фермента и способных перекрывать его доступ к субстрату и тем самым блокировать его активность; применение технологии РНК-интерференции, позволяющей подавлять транс-

ляцию определенной матричной РНК, кодирующей протеиназу вредителя. Соответствующие гены, кодирующие указанные типы ингибиторов или РНК, могут быть встроены в растения для придания им устойчивости.

Если в отношении некоторых видов насекомых могут быть эффективны существующие в природе ингибиторы их пищеварительных ферментов, то для ограничения численности высокоспециализированных вредителей с нечувствительными к известным стандартным ингибиторам протеиназами и α -амилазами (например, протеиназы и α -амилазы вредной черепашки или ряд протеиназ колорадского жука) необходимо отбирать из множества природных вариантов наиболее эффективные формы с помощью специальных подходов функциональной протеомики [103] или конструировать новые формы ингибиторов.

Главными факторами вредоносности вредной черепашки и других растительноядных клопов являются протеиназы и другие гидролазы, которые они вводят в созревающее зерно пшеницы для осуществления внекишечного пищеварения. Следы протеиназ клопов, оставшиеся в зерне, ухудшают качество клейковины, что сказывается на выпечке хлеба. Одним из многих возможных путей к ограничению активности протеиназ хлебных клопов могло бы быть использование белковых ингибиторов, однако эти ферменты нечувствительны к известным формам ингибиторов. Для конструирования ингибиторов необходимо располагать чистыми препаратами ферментов с известными характеристиками. В наибольшей мере этим требованиям соответствуют рекомбинантные формы ферментов, которые получают методом гетерологической экспрессии соответствующих генов в клетках микроорганизмов. Вредная черепашка располагает сложным набором протеиназ, участвующих во внекишечном пищеварении. Некоторые такие ферменты, принадлежащие к разным подсемействам сериновых протеиназ и синтезирующиеся в слюнных железах вредителя – гидролизующая глютенин зерна и родственная по структуре (но не по специфичности) трипсину протеиназа GHP3 [4, 72] и пролил-специфичная эндопептидаза [133] – были экспрессированы в клетках микроорганизмов, что позволило приступить к конструированию их ингибиторов. Эти ферменты существенно различаются по свойствам и субстратной специфичности, соответственно должны различаться и их ингибиторы. Перспективным шаблоном для ингибитора протеиназы GHP3 может являться, например, ингибитор SFTI-1 из подсолнечника, а для ингибитора пролил-эндопроотеазы исходными структурами могут служить пептидные продукты гидролиза белка молока – казеина [125]. Достигнутая степень ингибирования указанных ферментов еще невысока, но результаты указывают на возможность

получения более специфичных ингибиторов путем тонкой настройки структуры реактивных центров. Еще один перспективный подход к ограничению активности пищеварительных протеиназ вредной черепашки основан на РНК-интерференции. Обработка личинок клопов специфичной двухцепочечной РНК подавляла экспрессию цистеиновой протеиназы в кишечнике и приводила к снижению их веса и жизнеспособности [20].

Наиболее распространенный в природе механизм ингибирования протеиназ заключается в том, что элемент структуры молекулы ингибитора, обозначаемый как реактивный центр, имитирует природный белковый субстрат и связывается с активным центром фермента, блокируя его (в отличие от субстрата). С помощью специальных программ на компьютере строят пространственные модели молекул ферментов и ингибиторов и оценивают энергетические параметры их взаимодействия по отдельным аминокислотным остаткам. Знание параметров взаимодействия позволяет строить модели возможных эффективных ингибиторов для определенных ферментов. Такие модели создаются на основе структур известных ингибиторов и, в упрощенном виде, конструирование новых ингибиторов включает подбор аминокислотных остатков в реактивном центре, обеспечивающих оптимальное взаимодействие с остатками активного центра.

Из всего множества ингибиторов, выявленных у растений и животных, выбраны несколько типов, в наибольшей мере пригодных для использования в качестве «шаблонов» для конструирования новых специфичных ингибиторов. Некоторые из этих шаблонов уже успешно опробованы в медицине и физиологии, например, циклический ингибитор трипсина из семян подсолнечника SFTI-1 [69, 79, 89], тогда как представители семейства двуспирального ингибитора трипсина из семян вероники VhTI [33, 73, 91] считаются весьма перспективными исходными структурами для создания молекул с различными типами защитной активности. Можно отметить, что обе упомянутые малые пептидные структуры привлекают большое внимание специалистов из разных областей, поскольку манипуляции с отдельными аминокислотными остатками способны кардинально менять их биологическую активность. Так, структуры, подобные VhTI и широко представленные в защитных пептидах и ингибиторах протеиназ у многих растений, оказались очень близкими структурам нейротоксинов из ряда беспозвоночных, что позволяет, теоретически, конструировать новые типы защитных белков путем замены отдельных аминокислотных остатков [23].

Ингибитор из семян подсолнечника на сегодня признан самым мощным у растений ингибитором трипсина с необычно малым размером (всего 14 аминокислотных остатков) и уникальной для ингибиторов

из растений циклической молекулой [79]. Простота структуры и высокая стабильность к протеолизу послужили основанием для его использования многими исследователями в качестве базы для конструирования ингибиторов разнообразных сериновых протеиназ. Замена отдельных аминокислотных остатков можно существенно влиять на специфичность ингибитора, а встраивание коротких последовательностей, определяющих требуемую биологическую активность, в структуру SFTI-1 обеспечивает полученной химерной молекуле высокую устойчивость к протеолизу и разнообразным абиотическим факторам. Особенно интенсивно работают с ингибитором из подсолнечника в области медицины, где на его основе разрабатывают препараты для терапии опухолей, заболеваний крови, кожи, анальгетики и т.д. [9, 29, 30, 61, 102].

При всех кардинальных различиях между структурами SFTI-1 (замкнутое полипептидное кольцо, «перехваченное» дисульфидной связью) [79]) и VhTI (две α -спирали, соединенные двумя дисульфидными связями [33]), можно выделить ряд таких свойств, общих для данных белков, которые могут в какой-то мере способствовать лучшему пониманию оснований для их использования в качестве шаблонов для конструирования. Пока нет ясности относительно происхождения ингибитора SFTI-1 и его филогенетических связей с другими ингибиторами протеиназ. Решение этого вопроса могло бы как внести вклад в понимание функций данного белка в растении, так и расширить представления о возникновении и эволюции подобных защитных белков.

Молекула SFTI-1 по структуре соответствует реактивному центру ингибитора Bowman-Birk из сои, замкнутому в кольцо, тогда как все остальные элементы структуры классического ингибитора оказались как бы отброшенными. Ингибиторы семейства Bowman-Birk найдены только у злаков и бобовых. Из всех сложноцветных лишь *Helianthus annuus* L. и другие виды подсолнечника, а также близкого ему рода *Tithonia* Desf. ex Juss. являются носителями циклического ингибитора, соответствующего фрагменту ингибитора Bowman-Birk. У представителей других семейств семенных растений подобные ингибиторы не найдены [69, 71, 73, 41]. У близких подсолнечнику сложноцветных также найдены циклические пептиды, сходные по структуре с SFTI-1, однако не проявляющие активности по отношению к протеиназам [40]. По-видимому, это защитные пептиды с пока не установленной функциональной направленностью (возможно, антимикробной).

Похожая ситуация наблюдается и в случае VhTI-подобных пептидов, которые у разных растений обладают либо трипсин-ингибирующей, либо антимикробной, в том числе инактивирующей рибосомы активностью [33, 77, 81, 91]. Сходство SFTI-1-подоб-

ных и VhTI-подобных пептидов состоит в том, что они экспрессируются в составе одной полипептидной цепи с запасными белками семян – альбуминами и вицилинами соответственно [41, 81]. По-видимому, их основная роль заключается в защите запасных белков от микроорганизмов как при созревании, так и при прорастании семян посредством трипсин-ингибирующей и антимикробной активности. Мишенями подобных ингибиторов могут быть как внеклеточные трипсин-подобные протеиназы, характерные для многих фитопатогенных грибов [70], так и пищеварительные протеиназы насекомых.

Есть сведения в пользу защитной роли ингибиторов сериновых протеиназ, содержащихся в семенах подсолнечника, в отношении насекомых [24]. Как говорилось выше, у VhTI-подобных белков есть структурные гомологи среди токсинов беспозвоночных. Выяснилось, что у, казалось бы, эволюционно изолированного даже среди белков растений SFTI-1 есть гомолог среди белков животных. Среди множества защитных пептидов, секретлируемых клетками кожи некоторых амфибий, выявлен ингибитор трипсина размером 1,8 кДа, проявляющий высокую степень сходства с SFTI-1 [128]. Остается неясным, является ли гомология SFTI-1 с ингибитором из кожи лягушки результатом конвергентной эволюции или следствием произошедшего когда-то горизонтального переноса генов с участием, например, микроорганизмов, несущих гены белков, близких по структуре SFTI-1. Некоторые исследователи объясняют сходство SFTI-1 из подсолнечника с активным центром представителей семейства ингибитора Bowman-Birk бобовых и злаков конвергенцией, основываясь на том, что у сложноцветных есть множество переходных форм SFTI-1-подобных пептидов [41]. Таким образом, SFTI-1- и VhTI-подобные структуры самой природой используются для выполнения различных защитных функций, причем «переназначение» функций осуществляется за счет замен отдельных аминокислотных остатков. Относительная легкость «переключения» функций открывает широкие возможности для того, чтобы конструировать на основе таких структур новые белки, способные защищать растения от насекомых-фитофагов.

Приведенные выше сведения о защитных механизмах растений и о путях их использования при создании устойчивых к вредителям форм растений отражают лишь малую часть огромного объема исследований, проводимых по этой теме во всем мире. Хотя эффективность большинства из указанных механизмов уже доказана экспериментально, следует признать, что пока лишь единичные решения доведены до практического применения. Однако быстрое развитие современных технологий будет способство-

вать скорейшему практическому применению многих из описанных экологически безопасных подходов. При этом понимание закономерностей коэволюции насекомых и растений, а также молекулярных аспектов адаптации насекомых к различным защитным

факторам позволит сделать такие подходы более эффективными.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (гранты № 12-08-00885 и 15-08-04247)

Литература

Список русскоязычной литературы

1. Вилкова НА, Нефедова ЛИ, Фролов АН. Иммуниет семенных растений и его фитосанитарное значение в агроэкосистемах. Защита и карантин растений. 2015;(8):3-9.
2. Вилкова НА. Иммуниет растений к вредным организмам и его биоценотическое значение в стабилизации агроэкосистем и повышении устойчивости растениеводства. Вестник защиты растений. 2000;(2):3-15.
3. Вилкова НА, Конарев АВ. Современные проблемы иммуниета растений к вредителям. Вестник защиты растений. 2010;(3):3-15.
4. Долгих ВВ, Сендерский ИВ, Конарев АВ. Получение и свойства рекомбинантных протеиназ *Eurygaster integriceps* Put., гидролизующих глютеинин. Приклад биохимия и микробиол. 2014;50(5):466-74.
5. Долгих ВВ, Сендерский ИВ, Павлова ОА, Наумов АМ. Уникальные особенности энергетического обмена микроспоридий как результат длительной адаптации к внутриклеточному развитию. Паразитология. 2011;42(5):147-57.
6. Конарев АВ. Компонентный состав и генетический контроль ингибиторов α -амилаз насекомых из зерна пшениц и эгилопсов. Докл ВАСХНИЛ. 1982;(6):42-4.
7. Конарев АВ. Методы анализа компонентного состава ингибиторов α -амилаз и протеиназ у злаков. Приклад биохимия и микробиол. 1985; 21(1):92-100.
8. Конарев АВ. Системы ингибиторов гидролаз у злаков – организация, функции и эволюционная изменчивость. Автореф дисс докт биол наук. М.: Институт биохимии им А.Н. Баха; 1992.
9. Кузнецова СС, Колесанова ЕФ, Таланова АВ, Веселовский АВ. Перспективы создания новых ингибиторов терапевтически значимых сериновых протеаз на основе кноттинов и пептидного ингибитора трипсина из семян подсолнечника (SFTI 1). Биомед хим. 2016;62(4):353-68.
10. Максимов ИВ, Сорокань АВ, Нафикова АР, Беньковская ГВ. Возможность и механизмы действия *Bacillus subtilis* 26Д и *Beauveria bassiana* Уфа-2 при применении для защиты растений картофеля от фитофтороза и колорадского жука. Микол фитопатол. 2015;49(5):317-24.
11. Мосолов ВВ, Валуева ТА. Ингибиторы протеиназ в биотехнологии растений (обзор). Приклад биохим микробиол. 2008;44(3): 261-9.
12. Павлюшин ВА, Вилкова НА, Сухорученко ГИ, Фасулати СР, Нефедова ЛИ. Фитосанитарные последствия антропогенной трансформации агроэкосистем. Вестник защиты растений. 2008;(3):3-26.
13. Рукавцова ЕБ, Алексеева ВВ, Бурьянов ЯИ. Применение РНК-интерференции в метаболической инженерии растений (обзорная статья). Биоорг хим. 2010;36:159-69.
14. Шафикова ТН, Омеличкина ЮВ. Молекулярно-генетические аспекты иммуниета растений к фитопатогенным бактериям и грибам. Физиология растений. 2015;62:611-27.
15. Шеленга ТВ, Конарев АВ, Дзюбенко НИ. Эндифитные грибы рода *Neotyphodium* – выявление и идентификация у овсяницы луговой (*Festuca pratensis* Huds.). Методические рекомендации. Санкт-Петербург: ВИР; 2007.
16. Шеленга ТВ, Конарев АВ, Дзюбенко НИ, Малышев ЛЛ, Такаи Т. Изучение образцов овсяницы луговой из коллекции ВИР, содержащих симбиотические грибы-эндифиты рода *Neotyphodium*. Докл РАСХН. 2006;(1):20-2.

Общий список литературы/Reference List

1. Vilkova NA, Nefedova LI, Frolov AN. [Immunity of seed plants and its phytosanitary value in agroecosystems]. *Zaschita i Karantin Rasteniy*. 2015;(8):3-9. (In Russ.)
2. Vilkova NA. [Plant immunity against pest organisms and its role in stabilizing agroecosystems and plant growing]. *Vestnik Zaschity Rasteniy*. 2000;(2):3-15. (In Russ.)

3. Vilkova NA, Konarev AV. [Modern problems of plant immunity to pests]. Vestnik Zashchity rasteniy. 2010;(3):3-15. (In Russ.)
4. Dolgikh VV, Senderskiy IV, Konarev AV. Production and properties of recombinant glutenin-hydrolyzing proteinases from *Eurygaster integriceps* Put. Appl Biochem Microbiol. 2014;50(5):433-40. (English translation of Prikl Biokh Mikr.)
5. Dolgikh VV, Senderskiy IV, Pavlova OA, Naumov AM. [Unique characteristics of the energy metabolism in Microsporidia as a result of durational adaptation to the intracellular development]. Parazitologiya. 2010;45(2):147-57.
6. Konarev AV. Component composition and genetic control of insect alpha-amylase inhibitors from wheat and Aegilops grain. Soviet Agricultural Science. 1982;(6):68-71. (English Translation of Dokl VASKhNIL)
7. Konarev AV. [Methods for analyzing the composition of cereal α -amylase and proteinase inhibitors]. Prikl Biokh Mikrobiol. 1985;21(1):92-100. (In Russ.)
8. Konarev AV. [Systems of hydrolase inhibitors in cereals: organization, functions and evolutionary variability. DSc Thesis]. Moscow: AN Bach Institute of Biochemistry; 1992. (In Russ.)
9. Kuznetsova SS, Kolesanova EF, Talanova AV, Veselovsky AV. [Prospects for the design of new therapeutically significant protease inhibitors based on knottins and sunflower seed trypsin inhibitor (SFTI 1)]. Biomed Khim. 2016;62(4):353-68. (In Russ.)
10. Maksimov IV, Sorokan AV, Nafikova AR, Benkovskaya GV. [On the in principle ability and mechanisms of action of the concerted use of *Bacillus subtilis* 26D and *Beauveria Bassiana* Ufa-2 preparations for potato protection against *Phytophthora Infestans* and *Leptinotarsa decemlineata*]. Mikologiya i Fitopatologiya. 2015;49(5):317-24. (In Russ.)
11. Mosolov VV, Valueva TA. Proteinase inhibitors in plant biotechnology: A review. Appl Biochem Microbiol. 2008;44(3):233-40. (English Translation of Prikl Biokh Mikr. 2008;44(3):261-9)
12. Pavlyushin VA, Vilkova NA, Sukhoruchenko GI, Fasulati SR, Nefedova LI. [Phytosanitary consequences of anthropogenic transformation of agricultural ecosystems]. Vestnik Zashchity Rasteniy. 2008;(3):3-26. (In Russ.)
13. Rukavtsova EB, Alekseyeva VV, Buryanov YaI. The use of RNA interference for the metabolic engineering of plants (review). Russ J Bioorganic Chem. 2010;36(2):146-56. (English translation of Bioorg Chem. 2010;36(2):159-69).
14. Shafikova TN, Omelichkina YV. Molecular genetic aspects of plant immunity to phytopathogenic bacteria and fungi. Russ J Plant Physiol. 2015;62(5):571-85. (English translation of Fiziol Rast. 2015;62(5):611-27).
15. Shelenga TV, Konarev AV, Dzubenko NI. Endofitnye Griby Roda *Neotyphodium* – Vyavleniye i Identifikatsiya u Ovsianitsy Lugovoy (*Festuca pratensis* Huds.) Metodicheskiye Rekomendatsii. [Endophyte Fungi of Genus *Neotyphodium*: Detection and Identification in Meadow Fescue (*Festuca pratensis* Huds.) Methodological Guide]. Saint Petersburg: VIR; 2007. (In Russ.)
16. Shelenga TV, Konarev AV, Dzubenko NI, Malyshchikov LL, Takai T. [Study of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) accessions (from N.V.Vavilov institute collection) containing the endophyte fungi of genus *Neotyphodium* (= *Acremonium*)]. Dokl RASKhN, 2006;(1):20-2. (In Russ.)
17. Acevedo FE, Rivera-Vega LJ, Chung SH, Ray S, Felton GW. Cues from chewing insects – the intersection of DAMPs, HAMPs, MAMPs and effectors. Curr Opin Plant Biol. 2015;26:80-6.
18. Ahn JE, Zhu-Salzman K. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. J Insect Physiol. 2009;55:678-85.
19. Amirhusin B, Shade RE, Koiwa H, Hasegawa PM, Bressan RA, Murdock LL, Zhu-Salzman K. Soyacycstatin N inhibits proteolysis of wheat α -amylase inhibitor and potentiates toxicity against cowpea weevil. Econ Entomol. 2004;97:2095-100.
20. Amiri A, Bandani AR, Alizadeh H. Molecular identification of cysteine and trypsin protease effect of different hosts on protease expression, and RNAi mediated silencing of cysteine protease gene in the Sunn pest. Arch Insect Biochem Physiol. 2016;91(4):189-209.
21. Bateman KS, James MN. Plant protein proteinase inhibitors: structure and mechanism of inhibition. Curr Protein Pept Sci. 2011;12(5):340-7.
22. Becerra JX. On the factors that promote the diversity of herbivorous insects and plants in tropical forests. Proc Natl Acad Sci USA. 2015;112(19):6098-103.
23. Berkut AA, Usmanova DR, Peigneur S, Oparin PB, Mineev KS, Odintsova TI, Tytgat J, Arseniev AS, Grishin EV, Vassilevski AA. Structural similarity between defense peptide from wheat and scorpion neurotoxin permits rational functional design. J Biol Chem. 2014;289:14331-40.
24. Bhat NS, Puttarangappa, Virupakshappa K, Prasad DT. Proteinase inhibitor in sunflower seed and its influence on growth and development of capitulum borer *Helicoverpa armigera* (Hubner). In:

- Proc. 14th International Sunflower Conf. Beijing/ Shenyang; 1996. p. 523-32.
25. Blair MW, Muñoz C, Buendía HF, Flower J, Bueno JM, Cardona C. Genetic mapping of microsatellite markers around the arcelin bruchid resistance locus in common bean. *Theor Appl Genet.* 2010;121:393-402.
 26. Brar DS, Virk PS, Jena KK, Khush GS. Breeding for resistance to planthoppers in rice. In: Heong KL and Hardy B, eds. *Plant hoppers: new threats to the sustainability of intensive rice production systems in Asia.* Los Baños: International Rice Research Institute; 2009. p. 401-9.
 27. Broadway RM. The response of insects to dietary protease inhibitors. In: Michaud D, ed. *Recombinant Protease Inhibitors in Plants.* Landes Bioscience; 2000. p. 80-8.
 28. Celorio-Mancera MP, Greve LC, Teuber LR, Lavavitch JM. Identification of endo-and exo-polygalacturonase activity in *Lygus hesperus* Knight salivary glands. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2009;70(2):122-35.
 29. Chan LY, Craik DJ, Daly NL. Dual-targeting anti-angiogenic cyclic peptides as potential drug leads for cancer therapy. *Sci Rep.* 2016;6:35347.
 30. Chen W, Kinsler VA, Macmillan D, Di WL. Tissue kallikrein inhibitors based on the sunflower trypsin inhibitor scaffold – a potential therapeutic intervention for skin diseases. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166268. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0166268>
 31. Clemente A, Arques MC. Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. *World J Gastroenterol.* 2014;20:10305-15.
 32. Coaker G. Plant-pathogen effectors: Cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annu Rev Phytopathol.* 2016;54:419-41.
 33. Connors R, Konarev AV, Forsyth J, Lovegrove A, Marsh J, Joseph-Horne T, Shewry PR, Brady RL. An unusual helix-turn-helix protease inhibitory motif in a novel trypsin inhibitor from seeds of *Veronica (Veronica hederifolia L.)*. *J Biol Chem.* 2007;282:27760-8.
 34. de Andrade EC, Hunter WB. RNA interference – natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC). In: Abdurakhmonov IY, ed. *RNA Interference.* InTech; 2016. <http://dx.doi.org/10.5772/61612>.
 35. de Oliveira CFR, de Moura MC, Napoleão TH, Paiva PMG, Coelho LCBB, Macedo MLR. A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. *Pestic Biochem Physiol.* 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.01.006>
 36. Despres L, David JP, Gallet C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol. Evol.* 2007;22:298-307.
 37. Dobler S, Dalla S, Wagschal V, Agrawal AA. Community-wide convergent evolution in insect adaptation to toxic cardenolides by substitutions in the Na,K-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:13040-5.
 38. D'Ovidio R, Raiola A, Capodicasa C, Devoto A, Pontiggia D, Roberti S, Galletti R, Conti E, O'Sullivan D, De Lorenzo G. Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects. *Plant Physiol.* 2004;135:2424-35.
 39. Dunaevsky YE, Elpidina EN, Vinokurov KS, Belozersky MA. Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. *Mol Biol.* 2005;39(4):608-13.
 40. Elliott AG, Franke B, Armstrong DA, Craik DJ, Mylne JS, Rosengren KJ. Natural structural diversity within a conserved cyclic peptide scaffold. *Amino Acids.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-016-2333-x>
 41. Elliott AG, Delay C, Liu H, Phua Z, Rosengren KJ, Benfield AH, Panero JL, Colgrave ML, Jayasena AS, Dunse KM, Anderson MA, Schilling EE, Ortiz-Barrientos D, Craik DJ, Mylne JS. Evolutionary origins of a bioactive peptide buried within prealbumin. *Plant Cell.* 2014;26:981-95.
 42. Emebiri LC, Tan MK, El-Bouhssini M, Wildman O, Jighly A, Tadesse W, Ogbonnaya FC. QTL mapping identifies a major locus for resistance in wheat to Sunn pest (*Eurygaster integriceps*) feeding at the vegetative growth stage. *Theor Appl Genet.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-016-2812-1>.
 43. Every D, Sutton KH, Shewry PR, Tatham AS, Coolbear T. Specificity of action of an insect proteinase purified from wheat grain infested by the New Zealand wheat bug, *Nysius huttoni*. *J Cereal Sci.* 2005;42(2):185-91.
 44. Fakhoury AM, Woloshuk CP. Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and fungal alpha-amylases by a lectin-like protein. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2001;14:955-61.
 45. Fatehi F, Behamta MR, Zali AA. Evaluating the resistance to sunn pest (*Eurygaster integriceps* Put) and its relationship with high-molecular-weight glutenin subunit in wheat. In: *Proc. 11th Int Wheat Genet Symp, Brisbane, Australia, Vol. 3.* Sydney: University Press; 2008. p. 741-3.
 46. Ferrari S, Galletti R, Pontiggia D, Manfredini C, Lionetti V, Bellincampi D, Cervone F, De Lorenzo G. Transgenic expression of a fungal

- endo-polygalacturonase increases plant resistance to pathogens and reduces auxin sensitivity. *Plant Physiol.* 2008;146:669-81.
47. Fire AZ. Gene silencing by double-stranded RNA (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed* 2007;46:6966-84.
 48. Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Grossi-de-Sá MF. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. *Eur J Biochem* 2002;269:397-412.
 49. Frati F, Galletti R, De Lorenzo G, Salerno G, Conti E. Activity of endo-polygalacturonases in mirid bugs (Heteroptera: Miridae) and their inhibition by plant cell wall proteins (PGIPs). *Eur J Entomol.* 2006;103:515-22.
 50. Furch AC, van Bel AJ, Will T. Aphid salivary proteases are capable of degrading sieve-tube proteins. *J Exp Bot.* 2015;66:533-9.
 51. Gatehouse JA. Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. *Curr Protein Pept Sci.* 2011;12(5):409-16.
 52. Grossi de Sa MF, Mirkov TE, Ishimoto M, Colucci G, Bateman KS, Chrispeels MJ. Molecular characterization of a bean α -amylase inhibitor that inhibits the α -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. *Planta.* 1997;203:295-303.
 53. Grossi-de-Sa MF, Pelegrini PB, Vasconcelos IM, Carlini CR, Silva MS. Entomotoxic plant proteins: potential molecules to develop genetically modified plants resistant to insect-pests. In: Gopalakrishnakone P, ed. *Plant Toxins. Toxinology.* Dordrecht: Springer Science; 2015. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6728-7_13-1
 54. Hammer TJ, Bowers MD. Gut microbes may facilitate insect herbivory of chemically defended plants. *Oecologia.* 2015;179:1-14.
 55. Hansen AK, Moran NA. The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Mol Ecol.* 2014;23:1473-96.
 56. Heidel-Fischer HM, Vogel H. Molecular mechanisms of insect adaptation to plant secondary compounds. *Curr Opin Insect Sci.* 2015;8:8-14.
 57. Heinrich M. Has plant-insect coevolution had an impact on the human brain? *BioScience.* 2015.65(1):104-5.
 58. Howe GA, Jander G. Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol.* 2008;59:41-66.
 59. Hui DQ, Iqbal J, Lehmann K, Gase K, Saluz HP, Baldwin IT. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. V. Microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs. *Plant Physiol.* 2003;131(4):1877-93.
 60. Jamal F, Pandey PK, Singh D, Khan MY. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochem Rev.* 2013;12(1):1-34.
 61. Jendry C, Beck-Sickinger AG. Inhibition of kallikrein-related peptidases 7 and 5 by grafting serpin reactive-center loop sequences onto sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1). *ChemBioChem.* 2016;17:719-26.
 62. Jongsma M, Beekwilder J. Co-evolution of insect proteases and plant protease inhibitors. *Curr Protein Pept Sci.* 2011;12:437-47.
 63. Kaur R, Gupta AK. Insect amylase-plant amylase inhibitor interaction is key to success of transgenics against insect herbivory. *Biochem Anal Biochem.* 2015;4(4):1. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-1009.1000201>
 64. Kennedy DO. *Plants and the Human Brain.* Oxford University Press; 2014.
 65. Kessler A, Baldwin IT. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol.* 2002;53:299-328.
 66. Kessler A, Halitschke R, Baldwin IT. Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. *Science.* 2004;305:665-8.
 67. Kim J, Quaghebeur H, Felton GW. Reiterative and interruptive signaling in induced plant resistance to chewing insects. *Phytochemistry.* 2011;72:1624-34.
 68. Konarev AV. Interaction of insect digestive enzymes with plant protein inhibitors and host-parasite coevolution. *Euphytica.* 1996;92:89-94.
 69. Konarev AV, Anisimova IN, Gavrilova VA, Rozhkova VT, Fido R, Tatham AS, Shewry PR. Novel proteinase inhibitors in seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L.): polymorphism, inheritance and properties. *Theor Appl Genet.* 2000;100:82-8.
 70. Konarev AV, Anisimova IN, Gavrilova VA, Shewry PR. Polymorphism of inhibitors of hydrolytic enzymes present in cereal and sunflower seeds. In: Mugnozza GTS, Porceddu E, Pagnotta MA, eds. *Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance: Proc. XV EUCARPIA Congress, Viterbo, Italy, September 20–25, 1998.* Springer Netherlands; 1999. p.135-44. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-011-4475-9_16
 71. Konarev AV, Anisimova IN, Gavrilova VA, Vachrusheva TE, Konechnaya GY, Lewis M, Shewry PR. Serine proteinase inhibitors in the Compositae: distribution, polymorphism and properties. *Phytochemistry.* 2002;59:279-91.
 72. Konarev AV, Beaudoin F, Marsh J, Vilcova NA, Nefedova LI, Sivir D, Koxsel H, Shewry PR, Lovegrove A. Characterization of a glutenin-specific serine proteinase of sunn bug *Eurygaster integriceps* Puton. *J Agric Food Chem.* 2011;59(6):2462-70.

73. Konarev AV, Griffin J, Konechnaya GY, Shewry PR. The distribution of serine proteinase inhibitors in seeds of the Asteridae. *Phytochemistry*. 2004;65:3003-20.
74. Konarev AV, Lovegrove A. Novel detection methods used in conjunction with affinity chromatography for the identification and purification of hydrolytic enzymes or enzyme inhibitors from insects and plants. In: Magdeldin S, ed. *Affinity Chromatography*. InTech; 2012. p. 187-210. <http://dx.doi.org/10.5772/37618>
75. Konarev AV, Lovegrove A, Shewry PR. Serine proteinase inhibitors in seeds of *Cycas siamensis* and other gymnosperms. *Phytochemistry*. 2008;69:2482-9.
76. Konarev AV, Tomooka N, Ishimoto M, Vaughan D. Variability of the inhibitors of serine, cysteine proteinases and insect α -amylases in *Vigna* and *Phaseolus*. In: Mugnozza GTS, Porceddu E, Pagnotta MA, eds. *Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance: Proc. XV Eucarpia Congress, Viterbo, Italy, September 20-25, 1998*. Springer Netherlands;1999. p. 173-81. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-011-4475-9_20
77. Li F, Yang XX, Xia HC, Zeng R, Hu WG, Li Z, Zhang ZC. Purification and characterization of Luffin P1, a ribosome-inactivating peptide from the seeds of *Luffa cylindrica*. *Peptides*. 2003;24:799-805.
78. Luan JB, Chen W, Hasegawa DK, Simmons AM, Wintermantel WM, Ling KS, Fei Z, Liu S-Sh, Douglas AE. Metabolic coevolution in the bacterial symbiosis of whiteflies and related plant sap-feeding insects. *Genome Biol Evol*. 2015;7:2635-47.
79. Luckett S, Garcia RS, Barker JJ, Konarev AV, Shewry PR, Clarke AR, Brady RL. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. *J Mol Biol*. 1999;290:525-33.
80. Macedo MR, Freire MGM. Insect digestive enzymes as a target for pest control. *Invert Surviv J*. 2011;8:190-8.
81. Marcus JP, Green JL, Goulter KC, Manners JM. A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. *Plant J*. 1999;19:699-710.
82. Maulik A, Sarkar AI, Devi S, Basu S. Polygalacturonase-inhibiting proteins-leucine-rich repeat proteins in plant defense. *Plant Biology*. 2012;14(Suppl 1):22-30.
83. McHale L, Tan X, Koehl P, Michelmore RW. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol*. 2006;7(4):article 212. DOI:10.1186/gb-2006-7-4-212
84. Mehrabadi M, Bandani AR, Franco OL. Plant proteinaceous α -amylase and proteinase inhibitors and their use in insect pest control. *New Perspectives in Plant Protection*. InTech; 2012. <http://dx.doi.org/10.5772/39290>.
85. Mewis I, Appel HM, Hom A, Raina R, Schultz JC. Major signaling pathways modulate *Arabidopsis glucosinolate* accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. *Plant Physiol*. 2005;138:1149-62.
86. Mithöfer A, Boland W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu Rev Plant Biol*. 2012;63:431-50.
87. Musser RO, Hum-Musser SM, Eichenseer H, Peiffer M, Ervin G, Murphy JB, Felton GW. Herbivory: Caterpillar saliva beats plant defenses – a new weapon emerges in the evolutionary arms race between plants and herbivores. *Nature*. 2002;416:599-600.
88. Nakasu EY, Edwards MG, Fitches E, Gatehouse JA, Gatehouse AM. Transgenic plants expressing ω -ACTX-Hv1a and snowdrop lectin (GNA) fusion protein show enhanced resistance to aphids. *Front Plant Sci*. 2014;5:673. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00673>.
89. Northfield SE, Wang CK, Schroeder CI, Durek T, Kan MW, Swedberg JE, Craik DJ. Disulfide-rich macrocyclic peptides as templates in drug design. *Eur J Med Chem*. 2014;77:248-57.
90. Oliveira AS, Xavier-Filho J, Sales MP. Cysteine proteinases and cystatins. *Braz Arch Biol Technol*. 2003;46:91-104.
91. Oparin PB, Mineev KS, Dunaevsky YE, Arseniev AS, Belozersky MA, Grishin EV, Egorov TA, Vassilevski AA. Buckwheat trypsin inhibitor with helical hairpin structure belongs to a new family of plant defence peptides. *Biochem J*. 2012;446:69-77.
92. Oppert B, Morgan TD, Culbertson C, Kramer KJ. Dietary mixtures of cysteine and serine proteinase-inhibitors exhibit synergistic toxicity toward the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Comp Biochem Physiol*. 1993;105:379-85.
93. Orona-Tamayo D, Wielsch N., Blanco-Labra A, Svatos A, Farias-Rodríguez R, Heil M. Exclusive rewards in mutualisms: ant proteases and plant protease inhibitors create a lock-key system to protect *Acacia* food bodies from exploitation. *Mol Ecol*. 2013;22:4087-100.
94. Ostergaard H, Rasmussen SK, Roberts TH, Hejgaard J. Inhibitory serpins from wheat grain with reactive centers resembling glutamine-rich repeats of prolamin storage proteins. Cloning and characterization of five major molecular forms. *J Biol Chem*. 2000;275:33272-9.

95. Palle SR, Campbell LM, Pandeya D, Puckhaber L, Tollack LK, Marcel S, Sundaram S, Stipanovic RD, Wedegaertner TC, Hinze L, Rathore KS. RNAi-mediated ultra-low gossypol cottonseed trait: performance of transgenic lines under field conditions. *Plant Biotechnol J*. 2013;11:296-304.
96. Pandey D, Rajendran SRCK, Gaur M, Sajeesh PK, Kumar A. Plant defense signaling and responses against necrotrophic fungal pathogens. *J. Plant Growth Regul*. 2016;35:1159-74.
97. Park CS, Miller C. Mapping function to structure in a channel-blocking peptide: electrostatic mutants of charybdotoxin. *Biochemistry*. 1992;31:7749-55.
98. Petschenka G, Pick C, Wagschal V, Dobler S. Functional evidence for physiological mechanisms to circumvent neurotoxicity of cardenolides in an adapted and a non-adapted hawk-moth species. *Proc Biol Sci* 2013;280:20123089. DOI: 10.1098/rspb.2012.3089
99. Poelman EH, Dicke M. Plant-mediated interactions among insects within a community ecological perspective. *Annu Plant Rev*. 2014;47:309-37.
100. Popay AJ. Insect pests. In: Fribourg HA, Hannaway DB, West CP, eds. *Tall Fescue for the Twenty-first Century*. Amer Soc Agron Monograph Series 53; 2009. p. 129-49. <http://dx.doi.org/10.2134/agronmonogr53.c9>
101. Powell AL, van Kan J, ten Have A, Visser J, Greve LC, Bennett AB, Labavitch JM. Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol Plant Microbe Interact*. 2000;13:942-50.
102. Qiu Y, Taichi M, Wei N, Yang H, Luo KQ, Tam JP. An orally active bradykinin B1 receptor antagonist engineered as a bifunctional chimera of sunflower trypsin inhibitor. *J Med Chem*. 2016;60:504-10
103. Rasoolizadeh A, Munger A, Goulet MC, Sainsbury F, Cloutier C, Michaud D. Functional proteomics-aided selection of protease inhibitors for herbivore insect control. *Sci Rep*. 2016; 6:38827 <http://dx.doi.org/10.1038/srep38827>
104. Ray S, Gaffor I, Acevedo FE, Helms A, Chuang WP, Tooker J, Felton GW, Luthe DS. Maize plants recognize herbivore-associated cues from caterpillar frass. *J Chem Ecol*. 2015;41:781-92.
105. Richardson M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Meth Plant Biochem*. 1991;5:259-305.
106. Sanchez-Monge R, Gomez L, Garcia-Olmedo F, Salcedo G. New dimeric inhibitor of heterologous α -amylases encoded by a duplicated gene in the short arm of chromosome 3B of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Eur J Biochem*. 1989;183:37-40.
107. Sanchis V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. *Agron Sustain Dev*. 2011;31:217-31.
108. Schellenberger U, Oral J, Rosen BA, Wei JZ, Zhu G, Xie W, McDonald MJ, Cerf DC, Diehn SH, Crane VC, Sandahl GA, Zhao J-Z, Nowatzki TM, Sethi A, Liu L, Pan Z, Wang Y, Lu AL, Wu G, Liu L. A selective insecticidal protein from *Pseudomonas* for controlling corn rootworms. *Science*. 2016;354(6312):634-7.
109. Schroeder HE, Gollash S, Moore A. Bean α -amylase-inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L). *Plant Physiol*. 1995;107:1233-9.
110. Schwachtje J, Minchin PE, Jahnke S, van Dongen JT, Schittko U, Baldwin IT. SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(34):12935-40.
111. Shamsi TN, Parveen R, Fatima S. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. *Int J Biol Macromolec*. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.069>
112. Shelomi M, Danchin EGJ, Heckel DG, Wipfler B, Bradler S, Zhou X, Pauchet Y. Horizontal gene transfer of pectinases from bacteria preceded the diversification of stick and leaf insects. *Sci Rep*. 2016;6:26388. <http://dx.doi.org/10.1038/srep26388>
113. Smith CM, Clement SL. Molecular bases of plant resistance to arthropods. *Annu Rev Entomol*. 2012;57:309-28.
114. Spit J, Holtorf M, Badisco L, Vergauwen L, Vogel E, Knapen D, Broeck JV. Transcriptional analysis of the adaptive digestive system of the migratory locust in response to plant defensive protease inhibitors. *Sci Rep*. 2016;6; article 32460. <http://dx.doi.org/10.1038/srep32460>
115. Steppuhn A, Baldwin IT. Resistance management in a native plant: Nicotine prevents herbivores from compensating for plant protease inhibitors. *Ecol Lett*. 2007;10:499-511.
116. Strauss SY, Rudgers JA, Lau JA, Irwin RE. Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends Ecol Evol*. 2002;17:278-85.
117. Tabashnik BE, Brévault T, Carrière Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nat Biotechnol*. 2013;31(6):510-21.
118. Tanaka A, Tapper BA, Popay A, Parker EJ, Scott B. A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiont from insect herbivory. *Mol Microbiol*. 2005;57(4):1036-50.

119. Terra WR, Ferreira C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Physiol B Comp Biochem.* 1994;109:1-62.
120. Tétard-Jones C, Edwards R. Potential roles for microbial endophytes in herbicide tolerance in plants. *Pest Manag Sci.* 2016;72(2):203-9.
121. Underwood W. Contributions of host cellular trafficking and organization to the outcomes of plant-pathogen interactions. *Semin Cell Develop Biol.* 2016;56:63-73.
122. Vandendorpe G, Smagghe G, Van Damme EJ. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry.* 2011;72(13):1538-50.
123. van Eck L, Schultz T, Leach JE, Scofield SR, Pears FB, Botha AM, Lapitan NL. Virus-induced gene silencing of WRKY53 and an inducible phenylalanine ammonia-lyase in wheat reduces aphid resistance. *Plant Biotechnol J.* 2010;8(9):1023-32.
124. Vávra J, Lukeš J. Microsporidia and 'The Art of Living Together'. In: Rollinson D, ed. *Advances in Parasitology.* Academic Press; 2013. p. 253-320.
125. Vishram A, Clack B. Identification of prolyl endopeptidase (PEP) inhibitory peptides from *Lactobacillus helveticus* digestion of four recombinant bovine caseins. *FASEB J.* 2015;29(Suppl 1):894.12.
126. Volpicella M, Leoni C, Costanza A, De Leo F, Gallerani R, Ceci LR. Cystatins, serpins and other families of protease inhibitors in plants. *Curr Protein Pept Sci.* 2011;12:386-98.
127. Wang LZ, Beuerle T, Timbilla J, Ober D. Independent recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for safe accumulation of sequestered pyrrolizidine alkaloids in grasshoppers and moths. *PLoS One.* 2012;7(2):e31796. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0031796>
128. Wang M, Wang L, Chen T, Walker B, Zhou M, Sui D, Conlon JM, Shaw C. Identification and molecular cloning of a novel amphibian Bowman Birk-type trypsin inhibitor from the skin of the Hejiang Odorous Frog; *Odorrana hejiangensis*. *Peptides.* 2012;33(2):245-50.
129. Wato S, Kamei K, Arakawa T, Philo J, Wen J, Hara S, Yamaguchi H. A chimera-like α -amylase inhibitor suggesting the evolution of *Phaseolus vulgaris* α -amylase inhibitor. *J Biochem.* 2000;128:139-44.
130. Werteker M, Kramreither G. Relation between susceptibility to wheat bug attack and digestibility of glutenin. *J Cereal Sci.* 2008;47:226-32.
131. Wheat CW, Vogel H, Wittstock U, Braby MF, Underwood D, Mitchell-Olds T. The genetic basis of a plant-insect coevolutionary key innovation. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2007;104:20427-31.
132. Wybouw N, Dermauw W, Tirry L, Stevens C, Grbic M, Feyereisen R, Van Leeuwen T. A gene horizontally transferred from bacteria protects arthropods from host plant cyanide poisoning. *eLife.* 2014;3:e02365. DOI 10.7554/eLife.02365.001
133. Yandamuri RC, Gautam R, Darkoh C, Dareddy V, El-Bouhssini M, Clack BA. Cloning, expression, sequence analysis and homology modeling of the prolyl endopeptidase from *Eurygaster integriceps* Puton. *Insects.* 2014;5:762-82.
134. Yang LM, Fang ZY, Dicke M, van Loon JA, Jongsma MA. The diamondback moth, *Plutella xylostella*, specifically inactivates Mustard Trypsin Inhibitor 2 (MTI2) to overcome host plant defence. *Insect Biochem Mol Bio.* 2009;39:55-61.
135. Yarullina LG, Akhatova AR, Kasimova RI. Hydrolytic enzymes and their proteinaceous inhibitors in regulation of plant-pathogen interactions. *Russ J Plant Physiol.* 2016;63(2):193-203.
136. Yu X, Wang G, Huang S, Ma Y, Xia L. Engineering plants for aphid resistance: current status and future perspectives. *Theor Appl Genet.* 2014;127:2065-83.
137. Zhu F, Poelman EH, Dicke M. Insect herbivore-associated organisms affect plant responses to herbivory. *New Phytol.* 2014;204:315-21.
138. Zhu-Salzman K, Zeng R. Insect response to plant defensive protease inhibitors. *Annu Rev Entomol.* 2015;60:233-52.