

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт систематики и экологии животных

Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

УДК 595.7

Белоусова Ирина Анатольевна

**ВЛИЯНИЕ ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНТОМОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
КОРМОВОГО РАСТЕНИЯ (*BETULA PENDULA* ROTH.) НА
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА (*LYMANTRIA
DISPAR* L.) И ЕГО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ПАРАЗИТАМ**

03.02.05 – энтомология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель –

доктор биологических наук, профессор

В.В. Глупов

Новосибирск – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Непарный шелкопряд (<i>Lymantria dispar</i> L.)	9
1.2. Система триотрофа: растение – насекомое-фитофаг – паразит	11
1.3. Растения и насекомые, питающиеся ими	13
1.3.1. Энтومорезистентность растений	13
1.3.2. Ответ насекомых-фитофагов на энтومорезистентность растений	20
1.4. Насекомые и их паразиты	23
1.4.1. Паразиты – регуляторы численности массовых видов насекомых- фитофагов	23
1.4.2. Защитные механизмы насекомых против паразитов	24
1.5. Взаимодействие кормовых растений и паразитов насекомых	29
1.6. Заключение	33
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1. Объекты исследования	34
2.2. Схемы экспериментов	35
2.2.1. Влияние замедленной индуцированной энтومорезистентности, вызванной сильным повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда, параметры иммунитета и чувствительность его к вирусу ядерного полиэдроза	38
2.2.2. Влияние быстрой индуцированной энтومорезистентности, вызванной сильным повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда и параметры его иммунитета	39
2.2.3. Влияние быстрой индуцированной энтومорезистентности, вызванной сильным повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда, физиологические параметры антибактериальной защиты и чувствительность его к бактериям <i>B. thuringiensis</i>	41
2.2.4. Влияние замедленной индуцированной энтومорезистентности, вызванной слабым повреждением кормового растения, на жизнеспособность	

непарного шелкопряда, параметры иммунитета и зараженность его паразитоидами	42
2.2.5. Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности, вызванной слабым повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда, параметры иммунитета и зараженность его паразитоидами	43
2.3. Химический анализ листьев	43
2.4. Активность защитных физиологических параметров непарного шелкопряда против паразитов	45
2.5. Заражение насекомых и оценка их чувствительности к паразитам	50
2.6. Статистическая обработка данных	52
2.6.1. Влияние замедленной индуцированной энтоморезистентности, вызванной сильным повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда, параметры иммунитета и чувствительность его к вирусу ядерного полиэдроза	53
2.6.2. Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности, вызванной сильным повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда и параметры его иммунитета	54
2.6.3. Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности, вызванной сильным повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда, физиологические параметры антибактериальной защиты и чувствительность его к бактериям <i>B. thuringiensis</i>	54
2.6.4. Влияние замедленной и быстрой индуцированной энтоморезистентности, вызванной слабым повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда, параметры иммунитета и зараженность его паразитоидами	55
Глава 3. ВЛИЯНИЕ ЗАМЕДЛЕННОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНТОМОРЕЗИСТЕНТНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ СИЛЬНЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ КОРМОВОГО РАСТЕНИЯ, НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА, ПАРАМЕТРЫ	

ИММУНИТЕТА И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЕГО К ВИРУСУ ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА	56
Глава 4. ВЛИЯНИЕ БЫСТРОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНТОМОРЕЗИСТЕНТНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ СИЛЬНЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ КОРМОВОГО РАСТЕНИЯ, НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА И ПАРАМЕТРЫ ЕГО ИММУНИТЕТА	66
Глава 5. ВЛИЯНИЕ БЫСТРОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНТОМОРЕЗИСТЕНТНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ СИЛЬНЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ КОРМОВОГО РАСТЕНИЯ, НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЕГО К БАКТЕРИЯМ <i>B. THURINGIENSIS</i>	77
Глава 6. ВЛИЯНИЕ ЗАМЕДЛЕННОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНТОМОРЕЗИСТЕНТНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ СЛАБЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ КОРМОВОГО РАСТЕНИЯ, НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА, ПАРАМЕТРЫ ИММУНИТЕТА И ЗАРАЖЕННОСТЬ ЕГО ПАРАЗИТОИДАМИ	91
Глава 7. ВЛИЯНИЕ БЫСТРОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНТОМОРЕЗИСТЕНТНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ СЛАБЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ КОРМОВОГО РАСТЕНИЯ, НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА, ПАРАМЕТРЫ ИММУНИТЕТА И ЗАРАЖЕННОСТЬ ЕГО ПАРАЗИТОИДАМИ	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	101
ВЫВОДЫ	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	106

ВВЕДЕНИЕ

Среди многообразия взаимоотношений между растениями и насекомыми особое место занимает фитофагия. Для насекомых-фитофагов растения являются источником питательных веществ и энергии, которые необходимы им для увеличения размеров тела, развития, созревания половых продуктов, восполнения энергетических затрат при жизнедеятельности (Яхонтов, 1969). Следовательно, кормовые растения во многом могут определять состояние популяции фитофага. Известно, что химический состав растений не является постоянным. Он может изменяться в ответ на повреждение фитофагами (Larson, 2002, Naukiöja, 2006). Результатом таких изменений для насекомых часто является снижение их жизнеспособности и репродуктивной функции, а соответственно и угнетение популяции. Подобные изменения в растении могут проявляться в тот же сезон, в котором было нанесено повреждение. Это явление носит название быстрой индуцированной энтоморезистентности. Также, ответ многолетних растений может проявляться и в последующие вегетационные сезоны, что носит название замедленной индуцированной энтоморезистентности. Данное влияние может проявляться не только на самих насекомых, но и распространяться на последующих участников трофической цепи – паразитов (Cory, Hoover, 2006). Это может быть опосредовано или прямым взаимодействием растений и энтомопаразитов или через изменение защитных физиологических механизмов насекомых от паразитов.

Существует множество работ, посвященных взаимодействию насекомых-фитофагов и их кормовых растений (Walling, 2000, Larson, 2002, Naukiöja, 2006, Futuyma, Agrawal, 2012), а также насекомых и их паразитов (Глулов, 2001). Значительно меньшее количество работ описывает взаимоотношения в трехкомпонентной системе: растение – насекомое-фитофаг – паразит (Cory, Hoover, 2006). Однако большинство из них описывает только сам феномен существования взаимодействий внутри этой

системы. Единичные исследования, вскрывающие механизмы таких взаимодействий в подавляющем большинстве случаев посвящены сельскохозяйственным видам растений и агроценозам. Остаются практически неизученными механизмы взаимодействия в трехкомпонентных системах естественных биоценозов. В данной работе будет представлена система «*Betula pendula* Roth. – *Lymantria dispar* L. – паразит». Непарный шелкопряд (*L. dispar*) является представителем массовых видов фитофагов, способным дефолировать лесные насаждения на площадях в сотни тысяч гектар.

Цель – изучить влияние индуцированной энтоморезистентности кормового растения (*Betula pendula* Roth.) на жизнеспособность непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.), состояние его защитных систем и чувствительность к паразитам.

Задачи:

1) Изучить влияние **замедленной** и **быстрой** индуцированной энтоморезистентности, вызванной **сильным** повреждением кормового растения, на смертность, продолжительность развития личиночной стадии и массу куколок *L. dispar*.

2) Изучить влияние **замедленной** индуцированной энтоморезистентности, вызванной **сильным** повреждением кормового растения, на показатели иммунитета личинок *L. dispar* и его чувствительность к паразитам.

3) Оценить состояние ряда физиологических и иммунных параметров личинок *L. dispar* и их чувствительность к паразитам под действием **быстрой** индуцированной энтоморезистентности кормового растения, вызванной **сильным** повреждением.

4) Оценить смертность, продолжительность развития личиночной стадии, массу куколок *L. dispar*, состояние иммунитета и чувствительность к

паразитам при питании их на **слабо** поврежденных кормовых растениях в **текущем** и **предыдущем** вегетационных сезонах.

Научная новизна. Впервые показано снижение чувствительности фитофага к паразитоидам при его питании на слабо поврежденных в предыдущем году растениях. Впервые показано изменение активности пищеварительных ферментов под действием энтоморезистентности кормового растения для лесных чешуекрылых. Впервые показано влияние индивидуальных особенностей кормового растения на состояние иммунитета насекомых. Определены механизмы воздействия ответа *B. pendula* при дефолиации на *L. dispar* при разных уровнях численности фитофага. Показано, что при высокой численности фитофага энтоморезистентность кормового растения обусловлена в большей степени прямым влиянием на организм насекомого, чем изменением чувствительности к паразитам. Более того, данное влияние сильнее выражено в тот же год, что и было нанесено повреждение, по сравнению со следующим годом.

Практическая значимость. В работе определены растительные аллелохемики, которые потенциально могут оказывать негативное влияние на жизнеспособность *L. dispar*, что в дальнейшем может быть использовано для усовершенствования препаратов для искусственной регуляции численности фитофага. В частности, возможна разработка новых препаратов с добавлением терпеновых и фенольных соединений для подавления вспышек массового размножения шелкопряда.

Апробации работы. Материалы диссертации были представлены на Международной научной студенческой конференции (Новосибирск, 2009), Международной энтомологической конференции ENTO'09 (Великобритания, Шеффилд, 2009), X Европейском энтомологическом конгрессе (Великобритания, Йорк, 2014).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 8 научных работ, 5 из которых опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН и Университета Турку (Финляндия) за проведение химического анализа листьев, сотрудникам Лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН за неоценимую помощь в проведении исследований, к.б.н. В.В. Мартемьянову за неоценимую помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы, А.В. Гаврилюк, С.А. Белокобыльскому, В.С. Сорокиной, В.А. Рихтер, Р.Ю. Дудко за помощь в определении паразитоидов.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Непарный шелкопряд (*Lymantria dispar* L.)

Непарный шелкопряд является одним из наиболее распространенных вредителей лесов в мире. Он распространен в европейской части России до северной границы произрастания дуба, на Кавказе, в зонах мелколиственных лесов и лесостепи Сибири, в горах Средней Азии, на Алтае и в Саянах, в Приамурье, на Сахалине и Приморье, в Японии, а также в северо-восточных штатах США и на юго-востоке Канады, в Северной Африке, практически по всей Европе (Колтунов, 2006).

Непарный шелкопряд является широким полифагом, он повреждает около 500 видов растений из более чем 70 семейств (Ильинский, Тропин, 1965; Lance, 1983; Lazarevic et al., 2002). Фитофаг питается как лиственными, так и хвойными деревьями, однако в круг предпочитаемых растений для той или иной популяции входят местные лесообразующие деревья. В Европе и на Дальнем Востоке основными кормовыми деревьями для *L. dispar* являются различные виды дуба. В зонах мелколиственных лесов и лесостепей Сибири – осина, береза; в пойменных лесах – древовидные ивы, тополя, ильмовые, черемуха; в лесах горного Алтая – пихта, лиственница, сосна; в горных лесах Средней Азии – ель, пихта, яблоня, груша, клен (Колтунов, Пономарев, Федоренко, 1998).

Фитофаг предпочитает заселять сухие, хорошо освещенные и продуваемые насаждения. Например, в условиях Западной Сибири таковыми в первую очередь являются березовые и березово-осиновые колки, березовые рощи, а также березовые и тополевые искусственные лесополосы.

Уникальность и опасность этого вида заключается в способности к вспышкам массового размножения. Численность гусениц в такой период может достигать 10 000 особей на дерево, а площадь поврежденных лесных массивов превышать миллион гектар. На значительной части территории

вспышки наблюдается тотальное объедание деревьев (Колтунов, Пономарев, Федоренко, 1998; Бахвалов и др., 2002). Продолжительность вспышек может достигать 7-8 лет (Ильинский, Тропин, 1965). Для Западной Сибири характерна фаза вспышки (рост численности, эруптивная фаза, фаза разряжения), длящаяся 4-5 лет с последующей фазой депрессии в течение 6-7 лет.

В результате сильного объедания деревьев, снижается их жизнеспособность, устойчивость к засухе. Это приводит к изрежению, высыханию и, как правило, возникновению пожаров. В связи с этим, актуальным является контроль численности непарного шелкопряда, в частности, разработка методов биологического контроля. Биологическая борьба с непарным шелкопрядом (США, РФ, страны Европы) ведется в основном с использованием препаратов, основой которых являются энтомопатогенные бактерии *Bacillus thuringiensis* и вирус ядерного полиэдроза *L. dispar* (Van Frankenhuyzen, Reardon, Dubois, 2007). Эти препараты достаточно эффективны. Однако при их применении существуют и некоторые проблемы, например, нестабильность под действием ультрафиолета, снижение инфекционной нагрузки (дожди), снижение эффективности перорального заражения при снижении интенсивности питания при понижении температуры. В связи с этим, перспективным является создание эффективных препаративных форм (сохраняющихся в окружающей среде), поиск высоковирулентных штаммов и их активаторов, или же компонентов подавляющих иммунитет насекомых.

Биология вида

Непарный шелкопряд является моновольтинным видом, с четко выраженным половым диморфизмом. Бабочки откладывают яйца в июле-августе в зависимости от географических особенностей обитания популяции. Самки откладывают яйца, в виде группы яиц (200-500 шт.) прикрытых гидрофобным пушком с брюшных сегментов. В условиях Западной Сибири

они откладывают их в нижней части комля кормовых деревьев, в горных условиях самки – на выступах и в трещинах скальных пород, в условиях Дальнего Востока, в Европе и Северной Америке самки откладывают яйца на протяжении всего ствола дерева без выраженной приуроченности к комлю растения. Выход гусениц из яиц после диапаузы начинается в мае и зачастую сопряжен с набуханием и распусканием почек кормовых деревьев. В своем развитии гусеницы проходят 5 (самцы) и 6 (самки) возрастов. Следует отметить, что наибольший урон кормовым растениям гусеницы наносят в 4 и 5 возрастах. В третьей декаде июня гусеницы прекращают питаться и уходят на окукливание. Лет бабочек начинается в начале – середине июля и продолжается несколько недель. Бабочкам не требуется дополнительного питания для созревания половых продуктов, поэтому они сразу приступают к спариванию и откладке яиц (Ильинский, Тропин, 1965; Leonard, 1981; Коломиец, Богданова, 1992).

1.2. Система триотрофа: растение – насекомое-фитофаг – паразит

Насекомые-фитофаги способны увеличивать свой вес на 20% в день. Это обеспечивается высоким уровнем потребления пищи и, как следствие, сильным объеданием кормового растения. В фазе пика численности популяции они могут оставить целый массив деревьев без листьев или «голым» поле, засеянное сельскохозяйственными культурами. Наиболее существенный урон наносят эруптивные виды. Тысячи научных работ посвящены поиску методов борьбы с ними, существенная часть из них – изучению закономерностей динамики численности насекомых-вредителей (в том числе поиску потенциальных регулирующих агентов) (Brown et al., 2001; Hill, Griffiths, Thomas, 2011; Kausrub et al., 2012; Elder et al., 2013). Ранее в литературе существовало множество однокомпонентных теорий динамики численности, где авторами доказывалось существенное влияние на

численность популяции лишь одного какого-либо фактора (биотического или абиотического). Затем появилась синтетическая теория, демонстрирующая взаимосвязь множества различных факторов, действующих на насекомых в комплексе (Яхонтов, 1969; Schowalter, 2006). Однако изучение какого-либо объекта в такой системе достаточно трудоемко. Формулирование концепции «триотрофа» послужило мощным толчком в развитии представлений об изменении численностей насекомых-вредителей (Вилкова, 1979, Вилкова, Шапиро, 1984). Эта концепция основана на трофическом взаимодействии внутри трехкомпонентной системы: растение – насекомое-фитофаг – паразит (патоген, паразитоид). Формирование этой концепции являлось результатом материалов работ о способности качества кормового растения влиять на насекомых (Эдельман, 1963, Capinera, 1977), тем самым изменяя их функциональное состояние и, как следствие, их восприимчивость к паразитам.

Компоненты системы триотрофа достаточно тесно взаимосвязаны. Современные эволюционные работы показывают, что в появлении огромного биоразнообразия растений на планете большую роль сыграли насекомые-фитофаги (Ehrlich, Raven, 1964; Cornell, Hawkins, 2003). Постоянный пресс насекомых-фитофагов вызывал развитие морфологических и физиологических защитных механизмов у растений. Ключевую роль здесь сыграли вторичные метаболиты растений, оказывающие токсичное влияние на фитофагов. Разнообразие их достаточно велико. В частности, для семейства пасленовых характерно наличие различных алколоидов, для капустных – глюкозинолатов, для зонтичных – фуранокумаринов, для молочайных – фенолов и карденолидов, для маковых – алколоидов, для березовых – фенолов и т.д. (Futuyma, Agrawal, 2009).

В ходе эволюции увеличение разнообразия защитных механизмов среди растений неизбежно вело к увеличению разнообразия механизмов, обеспечивающих насекомым высокий уровень адаптивности к первым. Работы с использованием методов молекулярного датирования показывают,

что по крайней мере некоторые группы насекомых являются более молодыми, чем группы их кормовых растений (Winkler, Mitter, 2008). Например, показано, что адаптивная радиация белянок началась после расхождения *Brassicales* (Wheat et al., 2007). Как следствие достаточно интенсивной эволюции в течение последних 350 млн лет количество видов растительноядных насекомых значительно превосходит хищных, сапротрофных, копротрофных и др. (Futuyma, Agrawal, 2009).

По мере увеличения разнообразия насекомых, увеличивалось и количество их естественных врагов. В результате такой коэволюции сформировалось множество разнообразных систем «растение – насекомое-фитофаг – паразит». Уникальной особенностью таких систем является способность растений «управлять» паразитами не только благодаря опосредованному воздействию через насекомых, но и напрямую (Dicke, Baldwin, 2010; War et al., 2011). Кроме того, при таких тесных взаимоотношениях в системе триотрофа воздействие на один из компонентов каких-либо абиотических или биотических факторов, неизбежно ведет к изменениям и двух других компонентов (Bonello et al., 2003; Roberts, Paul, 2005).

1.3. Растения и насекомые, питающиеся ими

1.3.1. Энтومорезистентность растений

Энтومорезистентностью растений называют относительное количество наследственных качеств растений, которые влияют на конечную степень повреждения насекомыми в естественных условиях (Kloth et al., 2012).

Выделяют две категории энтومорезистентности: антиксеноз (направлен на предотвращение заселения насекомыми растений) и антибиоз (направлен на снижение жизнеспособности насекомого) (Fineblum, Rausher, 1995; Larson,

2002). Некоторые авторы включают в понятие энтоморезистентности еще и толерантность (направлена на компенсацию повреждений от насекомых) (Kloth et al., 2012).

Энтоморезистентность (антибиоз и антиксеноз) может быть опосредована механическими барьерами для питания насекомых (шипы, трихомы, высокий уровень лигнификации) и химическими. Однако, деление это условно. Например, трихома – это и механический барьер и химический, она может содержать отпугивающие вещества, токсины и др. (Schoonhoven, Van Loon, Dicke, 2005).

Энтоморезистентность может быть непосредственно направлена на физиологическое состояние насекомого-фитофага и/или опосредована привлечением хищников и паразитоидов. Например, терпены хвойных растений могут обладать и токсическим действием для фитофагов и привлекать паразитоидов (Dicke, Baldwin, 2010; War et al., 2011). Следствием прямого действия на физиологическое состояние могут быть изменения в иммунной системе насекомого, что, в конечном счете, скажется на чувствительности к паразитам.

Кроме того, энтоморезистентность растений разделяют на конститутивную и индуцированную (Шапиро, Вилкова, Слепян, 1986; Larson, 2002; Шкаликов, 2005). Показатели конститутивной защиты уже присутствует в растениях на момент встречи их с насекомыми. Обычно этот термин используется применительно к конкретным группам или видам насекомых. Например, наличие в растениях алкалоидов является типичным примером конститутивной резистентности для многих видов насекомых, но для тли *Myzus persicaea* алкалоиды не являются препятствием, растения из семейства пасленовых (богатых алкалоидами) входят в рацион их питания (Loxdale, Lushai, Harvey, 2011; Kloth et al., 2012). Показатели индуцированной защиты растений проявляются после контакта их с индуктором (насекомыми или химическими соединениями, выделяемыми соседними поврежденными растениями). Это разделение также условно.

Например, содержание фенольных соединений в листьях является типичным примером конститутивного иммунитета. В то же время увеличение концентрации фенолов в ответ на повреждение растения фитофагом является типичным примером индуцированного ответа (Haukioja, 2006).

Впервые данные о способности растений отвечать на повреждения были получены во второй половине прошлого века. Это касается не только насекомых, но и фитопатогенных микроорганизмов и других членистоногих (Ross, 1961; Кус, Caruso, 1977; Вилкова, Шапиро, 1984). Появление работ по изучению резистентности растений к насекомым было следствием накопления работ по изучению влияния разного качества кормового ресурса на состояние насекомых (Эдельман, 1963; Capinera, 1977; Scriber, Fenny, 1979; Scriber, Slansky, 1981).

На сегодняшний день существует множество исследований, демонстрирующих явление индуцированной энтоморезистентности. Для пяденицы *Eperrita autumnata* было показано, что при питании ее личинок на механически поврежденных деревьях *B. pubescens* у них замедлялось развитие (Haukioja, Niemela, 1977). А для непарного шелкопряда питание на искусственно дефолиированных растениях *Betula populifolia* и *Quercus velutina* приводило к снижению массы куколок, замедлению развития, увеличению смертности (Wallner, Walton, 1979). Исследования, проведенные на осине *Populus tremuloides* и гусеницах *Malacosoma disstria* показали снижение плодовитости насекомых под влиянием индуцированной резистентности растений (Parry, Herms, Mattson, 2003).

Изменения в состоянии и поведении насекомых при питании на поврежденных растениях связывают с изменениями качественного и количественного химического состава растений. Особую роль в механизмах индуцированной энтоморезистентности отводят вторичным метаболитам. Они представлены множеством групп различных химических соединений: глюкозинолаты, фенолы, терпеноиды, стероиды, производные жирных кислот, аминокислоты, оксид кремния, гликопротеины и т.д. (Запромётов,

1993; Felton, Gatehouse, 1996; Schoonhoven, Van Loon, Dicke, 2005; War et al., 2012; Mitofen, Boland, 2012). Рассмотрим ряд наиболее изученных из них.

Изотиоционаты, обнаруженные в семействе капустных, обладают нуклеофильными свойствами и, соответственно, способны нарушать структуру и функционирование белков и нуклеиновых кислот (Brown, Hampton, 2011). Индукцией этих агликонов растения обязаны глюкозинолат-мирозиновой системе (Bones, Rossiter, 1996; Rask et al., 2000; Textor, Gershenzon, 2009). При повреждении растений фитофагами, изолированные обычно гликозинолаты высвобождаются из вакуолей и подвергаются гидролизу мирозиной. В результате этой реакции и образуются эти токсичные агликоны (изотиоционаты). Интересно, что глюкозинолаты, выделяющиеся при питании фитофагами, также могут привлекать паразитоидов (Amirhusin et al., 2004).

В ответ на повреждение в растении также может происходить увеличение синтеза фенольных соединений. В механизме индуцированной защиты они работают в тандеме с полифенолоксидазой. Полифенолоксидаза вступает в контакт с фенолами при повреждении клеточных компартментов, в которых находятся последние. Этот фермент способствует образованию высокорекреационноспособных хинонов, обладающих высокой токсичностью для живых систем, за счет их высокой окислительной способности (Запрометов, 1993).

Сапонины обладают цитолитическим действием за счет своих липофильных свойств. Причем эти соединения токсичны не только по отношению к фитофагам, но и к фитопатогенным грибам. Их накопление в ответ на повреждение показано на томатах *Lycopersicon esulentum* (Bouarab et al., 2002).

Линалоол (монотерпен), выделяется в окружающую среду в ответ на повреждение, что было показано на деревьях ели *Picea sitchensis* (Byun-McKay et al., 2006). Его действие заключается в привлечении паразитоидов (Turlings et al., 1991).

Синтез ингибиторов трипсиновых протеаз индуцируются в *Nicotiana attenuata* при повреждении его *Manduca sexta*, что оказывает антифидантное действие на фитофага (Giri et al., 2006).

Неорганические компоненты тоже могут функционировать в индуцированной энтоморезистентности растений. Ассимиляция в клеточной стенке оксида кремния у травянистых растений в африканской саванне индуцируется при повреждении их фитофагами (McNaughton, Tarrants, 1983; McNaughton et al., 1985,). Это увеличивает жесткость растения и ускоряет износ мандибул фитофагов (Reynolds, Keeoing, Meyer, 2009).

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), интенсивно накапливается в растении при повреждении. При дальнейшем питании на таком растении насекомых, рецепторы ГАМК насекомых связываются с лигандом, что приводит к нарушению физиологических процессов, связанных с этим нейромедиатором (Bown, Hall, MacGregor, 2002).

С каждым годом в разнообразных растениях ученые находят все больше вторичных метаболитов, которые участвуют в индуцированной защите растений от насекомых. Какие-то из них относительно универсальны, другие исключительны, некоторые перекликаются с защитными реакциями против фитопатогенов и/или позвоночных животных, но разнообразие их огромно.

Медиаторами между повреждением растений и запуском «защитных» генов в растениях являются фитогормоны. В частности, жасмоновая кислота, салициловая кислота, этилен и др. (Lorenzo et al., 2003; Von Dahl, Baldwin, 2007; Smith, DeMoraes, Mesher, 2009; Thaler, Humphrey, 2012). Традиционно считалось, что жасмоновая и салициловая кислоты являются антогонистами. При этом жасмоновая кислота участвует в запуске «защитных» генов против листогрызущих фитофагов, в то время как салициловая в большей степени ответственна за защиту от фитопатогенов (Van Loon, Bakker, Pieterse, 1998; Kessler, Baldwin, 2002; Durrant, Dong, 2004). Однако в настоящее время появляется все больше и больше работ, показывающих более тонкую

настройку во взаимодействии этих двух гормонов (Stout, Thaler, Thomma, 2006; Thaler, Humphrey, Whiteman, 2012), хотя на данный момент не совсем ясную. Стоит также отметить, что при изучении медиаторов энтоморезистентности растений к фитофагам особняком стоят работы, проведенные на колюще-сосущих насекомых. В отличие от листогрызущих насекомых они обычно поражают значительно меньшую площадь растения. Возможно, именно поэтому ответ на них больше схож с ответом на фитопатогенов, чем на грызущих филлофагов (Walling, 2000).

Среди работ по изучению энтоморезистентности растений существенное количество работ посвящено изучению механизмов распознавания растениями повреждений (Hilker, Meiners, 2010). Хорошо описаны механизмы, связанные с механическим повреждением клеток листовой пластинки. Например, известно, что при повреждении липидной мембраны из нее высвобождается линоленовая кислота. Она в дальнейшем вступает в свой октадеканойдный путь преобразования и трансформируется в активный жасмонат, который приводит уже к экспрессии «защитных» генов (Smith, DeMoraes, Mescher, 2009). Помимо механического повреждения, защитные механизмы могут также запускать компоненты слюны фитофагов. Например, N-линоиноил-L-глутамин и N-линоленоил-L-глутамат, обнаруженные в слюне *M. sexta*, запускают индукцию в растении летучих «защитных» соединений и ингибиторов трипсиновых протеиназ (Roda et al., 2004). Кроме того, активно ведутся работы по изучению таких индукторов, как «прикосновение» (растяжение мембраны) и оставление мини-царапин щетинками на лапках насекомых (Hall et al., 2004). Механизмы защиты растений против филлофагов могут запускаться откладкой яиц на них (Hilker et al., 2002). Стоит также отметить, что индуктором защитных механизмов могут служить летучие соединения, индуцируемые соседними поврежденными растениями (Kessler et al., 2006, Baldwin et al., 2006). Например, для *Arabidopsis thaliana* было показано, что E-2-hexenal,

выделяемый поврежденными растениями приводит к увеличению ГАМК у соседних растений (Mirabella et al., 2008).

Большинство работ, посвященных изучению энтоморезистентности растений, проведены на однолетних растениях, таких как резуховидка, томат, тыква и др. Однако, для многолетних растений известен достаточно интересный феномен. Защитные механизмы у них могут проявляться в течение нескольких вегетационных сезонов после нанесения повреждений. Это явление получило название замедленной индуцированной энтоморезистентности, в отличие от быстрой индуцированной резистентности, проявляющейся в тот же вегетационный сезон, что и было нанесено повреждение (Haukioja, Niemela, 1997; Kaitaniemi et al., 1998; Osier, Lindroth, 2004; Haukioja, 2006). Parry с соавторами (2003) сравнили быструю и замедленную индуцированную энтоморезистентность *Populus tremuloides* на *Malacosoma disstria*. В этой работе степень влияния быстрого и замедленного ответа на насекомых не отличалась. В работах Бахвалова с соавторами (2002, 2006) замедленная индуцированная энтоморезистентность приводила к увеличению смертности личинок непарного шелкопряда, быстрая – не оказывала подобного влияния. Однако в данных работах энтоморезистентность была запущена искусственными повреждениями. В целом же индуцированная дефолиацией быстрая и замедленная энтоморезистентность показана для многих деревьев *Betula spp.* (Haukioja, Neuvonen, 1985; Ruuhola et al., 2008), *Pinus resinosa* (Krause, Raffa, 1995), *Pinus contorta* (Trewhella, Leather, Day, 1997), *Quercus rubra* (Roden, Mattson, 2008), *Populus tremuloides* (Roden, Mattson, 2008) и *Eucalyptus globulus* (Rapley et al., 2007). Поскольку эти работы различны по схеме экспериментов, изучаемым системам объектов, абиотическим условиям и т.д., остается неизвестным, какой из ответов (быстрый или замедленный) становится, в конечном счете, более эффективным в борьбе с фитофагами.

Все описанные выше процессы, происходящие в растениях в ответ на повреждения их насекомыми, имеют для растений определенную «цену».

Ресурсы растений уходят на синтез химических соединений, участвующих в механизмах индуцированной энтоморезистентности. В результате этого снижается прирост биомассы растений, их плодовитость, привлекательность для опылителей и т.д. Цена может зависеть от условий произрастания и конкретного механизма защиты. Например, считается, что увеличение синтеза фенолов обходится растениям «дешевле», чем дополнительный синтез алколоидов, так как при синтезе фенолов не расходуется азот (Mithofer, Boland, 2012). «Подсчет расходов» на защиту достаточно непростой процесс. В литературе встречаются несколько моделей, использующихся при подсчете (Zangerl, Bazzaz, 1992; Cipollini, Heil, 2010). В целом же, пока все элементы механизмов энтоморезистентности растений не будут достаточно изучены, точность подсчета реальной «цены» резистентности растений остается сомнительной.

Таким образом, при анализе работ по изучению энтоморезистентности растений возникает множество вопросов, на которые пока нет ответов. Насколько специфичен ответ растения по отношению к фитофагу? Насколько он перекрывается с ответом по отношению к фитопатогенам? Каково пороговое значение повреждения растений, вынуждающее его тратить ресурсы на защиту? Более того, для большинства видов растений ключевые защитные химические соединения остаются неизвестными, как и механизмы их действия на фитофагов. В частности, такой является система «*B. pendula* – *L. dispar*».

1.3.2. Ответ насекомых-фитофагов на энтоморезистентность растений

В результате взаимодействия с защитными компонентами кормовых растений, у насекомых сформировался ряд адаптационных механизмов по отношению к ним. Они могут проявляться в избегании кормовых субстратов с высоким содержанием токсичных метаболитов, накоплении вторичных

метаболитов в неизменном виде в организме, смене изоферментного состава пищеварительных ферментов, нейтрализации и детоксикации вторичных метаболитов и др.

Например, тля *Brevicoryne brassicae*, питающаяся на капустных не подвергается действию глюкозинолат-мирозиновой системы, поскольку не повреждает клетки растений, содержащие мирозиназу. Более того, она способна накапливать глюкозинолаты в лимфе и синтезировать собственную мирозиназу в гемоцитах, что является ее собственным защитным механизмом от хищников (MacGibbon, Pontoppidan, 2001; Francis et al., 2002).

Многие растительноядные насекомые могут питаться на растениях, чей защитный механизм сводится к продукции аттрактивных веществ для хищников, если привлекаемые хищники не способны питаться этим фитофагом. Таким насекомым является в первую очередь колорадский жук. Его защитным механизмом является его собственная токсичность по отношению к хищникам. Более того, он может использовать летучие соединения поврежденных растений для увеличения вероятности спаривания (Daloze, Braekman, Pasteels, 1986).

Комплекс гидролитических ферментов кишечника насекомых является одной из основных мишеней для действия защитных реакций растения, т.к. именно этими ферментами определяется доступность структурных веществ (белков, сахаров, липидов) для фитофагов. Поэтому ферменты кишечника фитофагов играют одну из ведущих ролей в механизмах адаптации насекомых к энтоморезистентности кормовых растений. В частности, при синтезе в кормовых растениях ингибиторов протеиназ в результате индуцированной энтоморезистентности, в кишечнике насекомого может изменяться состав ферментов, что приводит к уходу от действия этих ингибиторов. Так, например, скармливание листьев картофеля, обработанных жасмоновой кислотой (т.е. с имитацией индуцированной энтоморезистентности) колорадскому жуку, приводит к увеличению экспрессии цистеиновых протеиназ в его кишечнике. В обработанных

листьях при этом наблюдается синтез ингибиторов аспарагиновых протеиназ (Bolter, Jongsma, 1995).

Трансформация растительных ксенобиотиков, в организме насекомых осуществляется в основном детоксицирующей системой (Рославцева, 1994; Baldwin, Preston, 1999; Gatehouse, 2002). Так, например, активность эстераз в кишечнике у *Myzus persicae* увеличивается при питании на растениях табака с большим содержанием никотиновой кислоты по сравнению с питанием на растениях перца (Cabrera-Brandt, Fuentes-Contreras, Figueroa, 2010). Активность эстераз также увеличивается у личинок *Spodoptera litura* при повышенном содержании фенолов в кормовом растении (Ghumare, Mukherjee, 2003). Увеличение GST-активности (фермента детоксицирующей системы) было зафиксировано в кишечниках *Spodoptera frugiperda* и *Trichoplusia ni* при питании на субстрате с глюкозинолатами (Wadleigh, Yu, 1988).

Глюкозоксидаза из слюны личинок *Helicoverpa zea* снижает продукцию никотина табаком *Nicotiana tabacum*, синтез которого увеличивается в нем в ответ на повреждение (Musser et al., 2005).

Эти примеры наглядно демонстрируют процесс коэволюции растений и насекомых, в котором каждый из участников является фактором отбора для другого.

1.4. Насекомые и их паразиты

1.4.1. Паразиты – регуляторы численности массовых видов насекомых-фитофагов

Типичным регулирующим фактором популяций массовых видов филофагов является воздействие естественных врагов, в частности, паразитов (энтомопатогенов и паразитоидов), которые зачастую являются наиболее специализированными по отношению к своим хозяевам, и напрямую зависят от плотности их популяции. При увеличении плотности популяций фитофагов может происходить массовое инфицирование особей патогенами, что, в конечном счете, приводит к возникновению эпизоотий в их популяциях (Вейзер, 1972). Эпизоотии описаны для многих массовых видов филофагов, в том числе для непарного и кольчатого шелкопрядов, шелкопряда-монашенки, некоторых видов пилильщиков и пядениц (Вейзер, 1972; Тарасевич, 1975; Воробьева, 1976; Бахвалов, 2001; Steinkraus, 2004). В естественных условиях наиболее часто встречаются массовые заболевания лесных филофагов, вызванные энтомопатогенными вирусами и в меньшей степени — грибами и бактериями. Что касается регуляции численности фитофагов на фазах с низкой плотностью, здесь ключевую роль среди паразитов играют широкоспециализированные паразитоиды (Исаев и др., 1984).

Вирусы, грибы, бактерии и паразитоиды активно используются для регуляции численности насекомых-вредителей. Особое распространение получили препараты на основе бактерий *Bacillus thuringiensis* вследствие их эффективного действия на широкий спектр видов насекомых. Инсектицидная активность этих бактерий в большей степени опосредована действием дельта-эндотоксина, который формирует литические зоны в эпителии кишечника насекомых, вследствие чего споры *B. thuringiensis* могут проникать в гемоцель насекомого, прорасти и размножиться там.

Отличительной особенностью вирусных биопрепаратов является их высокая видоспецифичность. Для искусственной регуляции численности такого массового вредителя леса как непарный шелкопряд широко используются препараты на основе вируса ядерного полиэдроза *L. dispar* (Бенкевич, 1984; Bogenschutt, Maier, Trzebitzy, 1990; Grijpma, 1990; Lindroth, Hwang, Osier, 1999). Он проникает в организм гусениц пероральным путем при их питании листьями растений. Инфекция сначала поражает ткань кишечника, затем генерализуется по всему организму.

Классическим примером использования паразитоидов для регуляции численности насекомых является применение *Trichogramma* против фитофагов сельскохозяйственных культур. Данного паразитоида используют для борьбы с чешуекрылыми вредителями на таких культурах как хлопок, сахарный тростник, капуста, кукуруза, рис, томаты (Smith, 1996).

Таким образом, изучение взаимодействия насекомых и их паразитов является крайне важным для понимания механизмов естественной регуляции численности массовых видов насекомых-вредителей и разработки искусственных. Влияние факторов среды (в частности, качества потребляемой фитофагом пищи) на вышеописанные паразитарные системы может существенно модифицировать эти взаимодействия, что в конечном счете будет отражаться на популяционной динамике фитофага.

1.4.2. Защитные механизмы насекомых против паразитов

К защитным механизмам насекомых против патогенов и паразитоидов относится целый комплекс процессов от сложных поведенческих актов ухода от «врага» до тончайших молекулярных механизмов, приводящих к гибели паразита. В этих процессах задействованы практически все физиологические системы насекомого.

Первостепенным защитным фактором организма насекомого при контакте с паразитами являются его покровы (внешний скелет, хитиновая выстилка передней и задней кишки, перитрофическая мембрана средней кишки и хитиновая выстилка трахей) (Abraham, Jacobs-Lorena, 2004; Ma et al. 2005). Кроме того, на первых этапах взаимодействия с патогеном, ключевую роль могут сыграть пищеварительная система и симбионтная микрофлора кишечника насекомого. Особенно это актуально для вирусов и бактерий, для которых основным путем проникновения является пероральный (Broderick, Raffa, Handelsman, 2006; Ponnuel et al., 2012).

Следующим этапом защиты является врожденный иммунитет. У насекомых, которые не имеют адаптивной иммунной системы как таковой система врожденного иммунитета чрезвычайно развита. В ней принимают участие как клеточные элементы (перикардальные клетки, клетки жирового тела, фиксированные и свободноциркулирующие гемоциты, эпителиальные клетки среднего кишечника) (Глупов, 2001; Gupta, 2001b), так и различные гуморальные факторы (антимикробные пептиды, компоненты профенолоксидазного каскада, лектины, цитокины, нейропептиды, факторы коагуляции и репарации и др.) (Глупов, 2001; Gupta, 2001a; Iwanaga, Lee, 2005).

Иммунный ответ начинается с распознавания чужеродного объекта. Среди патоген-распознающих белков хорошо изучен гемолин. Этот белок был впервые выделен из плазмы *Hyalophora cecropia* (Anderson, Steiner, 1987), сейчас он обнаружен также у *B. mori*, *Hyphantria cunea*, *L. dispar*, *Antheraea pernyi*, *Antheraea mylitta*, *Plutella xylostella*, *Samia Cynthia* и др. (Lee et al., 2002; Li et al., 2005; Gandhe et al., 2006; Bao, Yamano, Morishima, 2007; Eum et al., 2007; Tanaka et al., 2008). Его относят к суперсемейству иммуноглобулинов. Функция его заключается в связывании липополисахаридов бактерий с гемоцитами, что, вероятно, приводит к фагоцитозу и узелкообразованию (Ladendorff, Kanost, 1991; Zhao, Kanost, 1996; Bettencourt et al., 1997; Daffre, Faye, 1997; Yu, Kanost, 2002). Кроме

того, активно изучаются и другие липополисахорид-связывающие белки (Koizumi et al., 1999; Shin et al., 2000; Yu, Kanost, 2000; Yu et al., 2006), а также пептидогликан-распознающие белки (Yoshida, Kinoshita, Ashida, 1996; Yu et al., 2002; Seitz et al., 2003; Onoe et al., 2007; Eum et al., 2007; Tanaka et al., 2008), β -1-3-гликан распознающие белки (Ochiai, Ashida, 1998; Ma, Kanost, 2000; Fabrick, Bacer, Kanost, 2003; Wang, Jiang, 2010), лектины (Vasta et al., 1999; Koizumi et al., 1999; Shin et al., 2000), липофорины (Kato et al., 1994; Kim et al., 2004; Leon et al., 2006; Rahman et al., 2006) и др. При взаимодействии с чужеродными агентами эти белки запускают различные каскады сериновых протеаз в плазме, каждая из которых обеспечивает ограниченный протеолиз последующей. Например, одна из таких протеаз приводит к протеолизу цитокина ENF (глутамин-аспарагин-фенилаланин) который обеспечивает лизис эноцитозидов и высвобождение профенолоксидазы (Clark, Pech, Stand, 1997; Wang, Jiang, Kanost, 1999). В свою очередь, проФО подвергается ограниченному протеолизу протеазами другого такого каскада, что приводит к ее активации и, соответственно, к участию ее в процессе меланизации чужеродного объекта. Еще один такой каскад приводит к активации цитокинов Spätzle, которые инициируют синтез антимикробных пептидов (Wang et al., 2007; An, Jiang, Kanost, 2010). Все эти каскады активно регулируются ингибиторами сериновых протеаз, называемых серпинами (Kanost, 1999; Gettins, 2002).

Итогом этих реакций являются четыре основных процесса изоляции и разрушения чужеродного объекта в гемоцеле насекомого: фагоцитоз, инкапсуляция (и гранулообразование), синтез антимикробных пептидов, меланизация.

Роль фагоцитоза в защите от бактерий для насекомых сложно переоценить. К примеру, гемоцит *Manduca sexta* способен фагоцитировать до 500 бактерий (Dean et al., 2004).

Инкапсуляция – иммунный процесс, направленный на изоляцию и элиминацию инородного объекта в полости тела насекомого, в результате

которого вокруг объекта образуется капсула - псевдоткань с концентрическими слоями гемоцитов, белками и меланином. Различают собственно инкапсуляцию (когда размеры изолируемого объекта значительно превышают размеры гемоцитов) и гранулообразование (когда размеры объекта соотносятся с размерами гемоцитов) (Глупов, 2001). После распознавания антигена гранулоцитами и плазмотацитами, происходит их активация и разрушение, вследствие чего выделяются коагулоген, различные адгезивные молекулы, антимикробные пептиды, компоненты профенолоксидазного каскада, хемотаксические факторы. Затем происходит объединение «вновь прибывших» гемоцитов в гладкую капсулу (Глупов, 2001, Gupta, 2001b). Слоев в капсуле от 25 до 75. Они могут различаться по регионам. У таракана *Blattella germanica* 2 региона: внутренний (6-9 слоев; 4 мкм) и внешний (8-11 слоев; 2,5 мкм); они разделены между собой узкой связкой некротических клеток. Процесс инкапсуляции завершается формированием «внешней оболочки» (Gupta, 2001b). Она представляет собой тонкий наружный слой гемоцитов (у таракана – 64 нм), может быть однослойной или многослойной. Отличие этого слоя от других заключается в том, что к нему гемоциты больше не присоединяются (Gupta, 1991). Следует отметить, что одну из ключевых ролей здесь играют интегрины, белковые молекулы на поверхности гемоцитов, обеспечивающие связывание клеток между собой (Lavine, Strand, 2003; Lavine, Chen, Stand, 2005). В конечном счете, капсула представляет собой следующее: в центре – инородный объект, вокруг него слой эумеланина и различных белков, затем – сильно уплощенные клетки и за ними – интактные гемоциты.

У насекомых обнаружено множество различных антимикробных пептидов. Синтезируются они гемоцитами, перикардальными клетками, клетками жирового тела, мальпигиевых сосудов и среднего кишечника (Dunn, Bohnert, Russell, 1994; Lavine, Chen, Stand, 2005). Среди них: цекропин-, аттацин-, гловерин-, лизоцим-, лебоцин-, дефензин-, дрозоцин-, диптерицин-, сапещин-подобные пептиды. Например, лизоцим катализирует

гидролиз β -1-4-гликозидной связи между остатками N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмураминовой кислоты пептидогликана клеточной стенки грамположительных бактерий (Jolles, Jolles, 1984). Он также активен против грамотрицательных бактерий (Yu et al., 2002) и грибов (Vilcinskis, Matha, 1997). Цекропины и дефензины нарушают целостность клеточных стенок бактерий, образуя в них ионные каналы (Voman et al., 1991; Lee et al., 2004). Активно изучаются механизмы активации синтеза этих белков (Toll-рецепторы гемоцитов, их лиганды, транскрипционные факторы и др.) (Tanaka et al., 2005; Cheng et al., 2008).

Процесс меланизации играет одну из ключевых ролей в элиминации патогенных микроорганизмов в полости тела насекомого. Меланин изолирует антиген от окружающей его лимфы и способствует его уничтожению. Синтез меланина из катехоламинов лимфы катализирует фермент фенолоксидаза (ФО) (Nappi, Christensen, 2005; Cerenius, Lee, Soderhall, 2008). Его активации предшествует ферментативный профенолоксидазный каскад (Sato et al., 1999, Глупов, 2001; Cerenius, Soderhall, 2004; Iwanaga, Lee, 2005). Следует отметить, что активаторами каскада могут служить как биотические субстанции (липополисахариды, пептидогликаны, β -1,3-гликаны, паразиты, абберантные ткани), так и абиотические (хлороформ, стеклянные шарики, нейлоновые волокна) (Gupta, 2001a; Глупов, 2001). Важной особенностью меланогенеза является образование ряда промежуточных высокореактивных продуктов, опосредующих киллерный механизм при инкапсуляции (Глупов, 2001).

Иммунная система насекомых не ограничивается вышеописанными основными процессами. К ней также относятся процессы коагуляции, репарации и др. (Williams, 2007; Cerenius, Sodehall, 2011). Изучение этих процессов осложняется тем, что иммунная система имеет множество отличительных особенностей у разных отрядов насекомых (Invertebrate Immunity..., 2010). Кроме того, она также зависит от стадии развития, пола, времени суток, количества потребляемой энергии и др. (Elettherianos et al.,

2008; Schneider, 2009). Различия в иммунном ответе наблюдаются и при разных видах инфекции и паразитизма. Считается, что в борьбе с бактериями наиболее эффективны фагоцитоз и антимикробные пептиды (Dunn, Bohnert, Russell, 1994; Lavine, Stand, 2005; Freitak, Wheat, Heckel, 2007), с грибами – фагоцитоз, инкапсуляция, меланизация (Gillespie et al., 2000), с вирусом – апоптоз и инкапсуляция клеток зараженной ткани (Clem, 2007), с нематодами и паразитоидами – инкапсуляция и меланизация (Kraaijeveld, Van Alphen, Godfray, 1998; Smilanich et al., 2009).

Следует отметить, что при взаимодействии с патогенами насекомые направляют защитные механизмы не только на самого патогена, но на его токсичные метаболиты. У насекомых эти механизмы связаны с детоксицирующей системой. Как правило, трансформация этих метаболитов осуществляется ферментативно, за счет гидролаз и оксидоредуктаз (Серебров и др., 2006; Мартемьянов и др., 2009).

Таким образом, защитные системы насекомых весьма разнообразны и многокомпонентны. Во многом именно ими определяется успешность или не успешность паразитов насекомых.

1.5. Взаимодействие кормовых растений и паразитов насекомых

Кормовое растение может не только напрямую воздействовать на жизнеспособность насекомых, но и влиять на их взаимоотношение с патогенами и паразитоидами.

Существуют немногочисленные работы по изучению прямого влияния кормовых растений на энтомопатогенных микроорганизмов. Например, некоторые растения продуцируют щелочной экссудат, содержащий ионы цинка, магния и кальция, которые могут инактивировать бакуловирус (Duffey et al., 1995). Снижение количества воскового налета на горохе увеличивает адгезию и, как следствие, прорастание грибов *Pandora neoaphidus* на тле

Acyrtosiphon Pisum (Duetting et al., 2003). Жизнеспособность вируса ядерного полиэдроза *Operophtera brumata* сохраняется дольше на *Picea sitchensis*, чем на *Quercus robur* или на *Calluna vulgaris* (Raymond et al., 2005). Кроме того, некоторые патогены, например денсовирус тлей *Myzus persica*, способны распространяться по проводящей системе растения, тем самым увеличивая вероятность заражения насекомого (Van Munster et al., 2005).

Давно известно, что недостаток питания снижает резистентность насекомых к паразитам. Однако и качество потребляемой пищи может оказывать влияние на восприимчивость насекомых к различным патогенам. Например, добавление в пищу фенолов растительного происхождения увеличивает чувствительность *Heliothis armigera* к *B. thuringiensis* (Sivamani et al., 1992). Личинки *Malacosoma disstria* показывают разную восприимчивость к *B. thuringiensis* при питании на разных видах кормовых растений. На менее предпочитаемом растении *Acer saccharum* ЛК50 уменьшается в 100 раз по сравнению с *Populus tremuloides* (Kouassi et al., 2001). Изменение чувствительности к бакуловирусной инфекции в зависимости от вида кормового растения также показано для личинок *L. dispar* (Keating, Yendol, Schltz, 1988), *Spodoptera exigua* (Farrar, Ridgway, 2000), *Heliothis virescens* (Forschler, Young, Felton, 1992), *Panolis flammea* (Hodgson et al., 2002). «Затраты» на резистентность к *B. thuringiensis* различаются у *Trichoplusia ni* на разных растениях-хозяевах (Janmaat, Myers, 2005). Чувствительность к вирусу *Helicoverpa zea* выше при питании его на вегетативных органах сои и клевера, чем при питании на генеративных органах (Ali et al., 1998).

В зависимости от того, на каком растении питаются насекомые, изменяется не только их чувствительность к патогенам, но и эффективность размножения самого патогена. Например, для *H. zea* и *H. virescens* урожайность бакуловируса снижается в десять раз при питании их на хлопке по сравнению с питанием на сое и малиновом клевере *Trifolium incarnatum* (Ali et al., 2002). Энтомопатогенные грибы *Neozygites tanajoae* продуцируют

больше конидий под воздействием летучих соединений с листьев, поврежденных растений *Mononychellus tanajoe* (Hountondji et al., 2005).

Кроме того, в последние годы опубликованы результаты исследований, отражающие ещё одну сторону взаимоотношений между насекомыми-филлофагами и их паразитами. Это изучение влияния качества потребляемой пищи на состояние врождённого иммунитета насекомых. В работе Ojala с соавторами (2005) показано, что в зависимости от вида кормового растения может изменяться активность инкапсуляции нейлонового имплантата в гемолимфе подорожницы обыкновенной *Parasemia plantaginis*. В эксперименте было использовано 5 кормовых субстратов с разным содержанием вторичных метаболитов, в частности, флавоноидов и танинов. С увеличением концентрации этих метаболитов в корме происходило увеличение степени инкапсуляции нейлонового имплантата в гемоцеле насекомого. Lee с соавторами (2006) было проведено исследование по влиянию различного соотношения белков и сахаров в искусственной питательной среде (имитирующей растительный субстрат) на показатели врожденного иммунитета египетской хлопковой совки *Spodoptera littoralis*: лизоцим-подобную и фенолоксидазную активность лимфы, количество гемоцитов в гемолимфе, интенсивность процесса инкапсуляции. Ими было выявлено, что при увеличении концентрации белка в пищевом субстрате происходит значительное увеличение активности иммунных процессов. Более того, выживаемость при инфицировании вирусом тоже увеличивалась при питании личинок на среде богатой белком. Ранее в нашей лаборатории было показано, что при питании гусениц непарного шелкопряда на ранее тотально дефолиированных деревьях *B. pendula*, у личинок снижалась масса при инфицировании их бакуловирусом по сравнению с инфицированными гусеницами, питающихся на контрольных деревьях (Мартемьянов и др., 2009).

При изучении влияния кормового растения на взаимоотношения между насекомыми и их естественными врагами, наиболее интересны работы по

изучению влияния индуцированной энтоморезистентности растений. Поскольку ее проявления связаны с изменением популяционной плотности насекомых и, соответственно, с изменением спектра паразитов. Таких работ достаточно мало. В работе Hunter, Schultz (1993) было показано, что питание гусениц *L. dispar* листьями ранее дефолиированного дуба *Quercus rubra* приводит к увеличению смертности от бакуловируса в результате изменения содержания фенольных соединений в листьях растений. Авторы объяснили данный феномен прямым воздействием фенолов на активированный бакуловирус в просвете кишечника насекомых. Что при этом происходит с восприимчивостью самих насекомых не известно.

Прямое влияние индуцированной энтоморезистентности кормового растения на взаимоотношения между насекомыми и их естественными врагами, которые способны к активному перемещению, часто опосредованно их привлечением летучими метаболитами растений, выделяющимися при повреждении (Fatouros et al., 2005; Dicke, Baldwin, 2010; War, 2011).

Очень слабо изучен вопрос о влиянии индуцированной энтоморезистентности кормового растения на иммунитет насекомых. Одна из работ была проведена на модели «*Pieris rapae – Brassica oleracea – Cotesia glomerat*» (Bukovinszky et al., 2009). Авторы показали, что индуцированная резистентность снижает уровень инкапсуляции яиц паразитоида у личинок белянки, питающихся на ранее поврежденном растении. Карагі с соавторами (2006) показали, что замедленная индуцированная энтоморезистентность *B. pubescens* увеличивает активность инкапсуляции имплантата в гемоцеле куколок *E. autumnata* на 13%. Быстрая индуцированная резистентность не оказывает такого эффекта.

1.6. Заключение

На сегодняшний день достаточно большое количество научных работ посвящены изучению взаимоотношений насекомых-фитофагов и их кормовых растений, в особенности индуцированной энтоморезистентности растений. Для некоторых растений показаны молекулярные механизмы формирования ответа на фитофага. Однако многое еще остается не ясным. Например, насколько существенен вклад индуцированной энтоморезистентности и, в целом, качества кормового ресурса в популяционную динамику насекомых-фитофагов? Может ли она быть связана с механизмами формирования вспышек массового размножения эруптивных видов?

Значительно меньшее количество исследований посвящено влиянию индуцированной энтоморезистентности кормового растения на паразитов насекомых. Большая часть из них связывает индуцированную энтоморезистентность растений с паразитоидами. Работ, где третьим компонентом выступал бы патоген – единицы. Установлен только факт такого влияния (индуцированная резистентность – патоген). Неизвестно, каким механизмом оно опосредованно, через физиологическое состояние насекомого или прямым взаимодействием с патогеном? Как влияет индуцированная энтоморезистентность кормовых растений на конкурентные взаимоотношения между организмами третьего трофического уровня? Возможно ли, что именно за счет нее на разных фазах популяционной динамики насекомых-фитофагов преобладают разные паразиты? И наконец, остается открытым главный вопрос: где вклад индуцированной энтоморезистентности больше, в прямом влиянии на фитофага или через паразитов?

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Для экспериментов личинок *L. dispar* выводили из яиц, собранных в естественных биоценозах. Место сбора кладок зависело от того, на какой фазе численности находилась популяция в этой местности для того, чтобы эта фаза совпадала с моделируемой фазой в каждом эксперименте. При моделировании сильных повреждений кормового растения, использовали кладки из регионов, где плотность составляла не менее 1-10 кладок/дерево. При моделировании низкого уровня повреждения – около 0,05 кладок/дерево. Кладки собирали осенью, хранили при +4°C. Отрождение личинок было синхронизировано с весенним выходом *L. dispar* в регионе, где проводили эксперименты. Личинок младших возрастов выращивали в условиях лаборатории. Это объясняется их высокой миграционной активностью и малыми размерами, что делает невозможным их содержание непосредственно на экспериментальном дереве. Затем, в зависимости от эксперимента, опытных насекомых или оставляли в лабораторных условиях или перемещали в «садки-фонари» на экспериментальные деревья. Плотность насекомых при содержании составляла: 30-50 шт на 5ти литровый контейнер при содержании в лаборатории или 30 шт на садок при выращивании на деревьях. Садки-фонари представляли собой мешки из капроновой мелкоячеистой сетки, размером 80*30 см.

Деревья *B. pendula*, использованные в экспериментах, произрастают в окрестностях поселка Кольцово и города Карасука Новосибирской области, РФ (Западная Сибирь). В экспериментах участвовали деревья из колков, где не наблюдалось видимой дефолиации в течение минимум 3х лет до проведения экспериментов. В каждом из экспериментов использовали деревья отличные от деревьев других экспериментов. Деревья в колке выбирались случайным образом, однако они визуально выравнивались по

размеру и влиянию на них различных абиотических факторов (положение в колке относительно сторон света, удаленность от опушки и т.д.). В экспериментах, где необходимо было достичь дефолиации практически всей кроны, использовали небольшие деревья (около 10-12 лет). В экспериментах, где повреждения растений были минимизированы, использовали крупные деревья, возрастом около 20 лет. При скармливании листьев березы насекомым находящимся не на дереве, а в лабораторных условиях, срезание листьев осуществляли «под черешок». Считается, что такое повреждение растений не вызывает достоверных биохимических изменений в листьях, значимых для питания насекомых (Osier, Hwang, Lindroth, 2000). Срезанные листья помещались в контейнеры с насекомыми в пробирках с водой, которая изолировалась от насекомых парафиновой пленкой.

2.2. Схемы экспериментов

В данной работе представлены результаты пяти экспериментов, общая схема которых имела единую структуру. Первый этап экспериментов заключался в запуске механизмов энторморезистентности березы посредством объедания ее личинками непарного шелкопряда. Второй этап – питание на поврежденных растениях личинок (отличных от личинок на первом этапе). Третий – оценка параметров жизнеспособности насекомых второго этапа, оценка активности их защитных механизмов против паразитов, а также фактической чувствительности к разным видам паразитов. Кроме того, еще одна существенная часть этих экспериментов заключалась в оценке концентраций вторичных метаболитов в листьях экспериментальных растений. На всех этапах эксперимента изучаемые параметры опытных групп растений и насекомых сравнивали с параметрами контрольных групп (березами, не поврежденными непарным шелкопрядом и личинками, питающимися на них).

Три из пяти проведенных экспериментов посвящены изучению системы «*B. pendula* – *L. dispar* – паразит» при **высоких** уровнях численности непарного шелкопряда. В этих экспериментах моделировались условия, при которых повреждение кроны кормовых растений составляло не менее 75%.

Первый из цикла этих трех экспериментов (Эксперимент №1) был спланирован нами, основываясь на работах Бахвалова с соавторами (2002, 2006). Авторы показали, что замедленный индуцированный ответ *B. pendula*, вызванный **искусственными** повреждениями поверхности листовых пластинок, оказывает существенное влияние на показатели жизнеспособности *L. dispar*. В нашем эксперименте мы моделировали замедленный индуцированный ответ *B. pendula*, вызванный **объеданием растений личинками *L. dispar***. В качестве модельного патогена в этом эксперименте использовали вирус ядерного полиэдроза *L. dispar* (ВЯПД). Именно с этим паразитом нередко связана массовая гибель непарного шелкопряда в условиях его высокой численности в естественных биоценозах (Бахвалов, Колтунов, Мартемьянов, 2010).

Во втором эксперименте (Эксперимент №2) мы моделировали быструю индуцированную энтоморезистентность *B. pendula*, вызванную, как и в первом эксперименте, сильным объеданием растений личинками непарного шелкопряда.

И в первом и во втором эксперименте насекомые содержались в природных условиях на экспериментальных деревьях, что значительно приближало условия эксперимента к процессам, происходящим в естественных биоценозах.

Оценку концентраций вторичных метаболитов в листьях экспериментальных растений проводили только в вышеописанных двух экспериментах. Были проанализированы фенолы и летучие соединения листьев *B. pendula*.

Основываясь на результатах эксперимента №2, в котором было показано, что быстрая индуцированная энтоморезистентность кормового

растения приводит к увеличению активности компонента антибактериальной защиты непарного шелкопряда, был проведен третий эксперимент (Эксперимент №3). Целью его было детальное изучение механизмов антибактериальной защиты насекомых при действии быстрой индуцированной энтоморезистентности кормового растения. В качестве модельного паразита в этом эксперименте участвовали бактерии *B. thuringiensis*. В ходе эксперимента насекомые на протяжении всего периода развития оставались в лабораторных условиях. Данное изменение по сравнению с двумя предыдущими экспериментами позволило существенно снизить гибель насекомых от факторов внешней среды, которая может существенно маскировать менее значимые эффекты.

Другая группа экспериментов была посвящена изучению системы «*B. pendula* – *L. dispar* – паразит» на **низких** уровнях численности непарного шелкопряда. В этих экспериментах повреждение кормовых растений составляло не более 5%. В одном из экспериментов моделировался замедленный ответ кормового растения (Эксперимент №4), в другом – быстрый (Эксперимент №5). В качестве модельного паразита в этих экспериментах участвовали паразитоиды естественных ценозов. По нашим визуальным наблюдениям на низких уровнях численности непарного шелкопряда именно они играют существенную роль в регуляции непарного шелкопряда в той местности, где проводились эксперименты (Западная Сибирь).

Во всех экспериментах в качестве критериев жизнеспособности насекомых оценивались следующие показатели: смертность, время развития насекомых до стадии куколки, масса куколок. Следует отметить, что личиночная стадия большинства насекомых-фитофагов является наиболее уязвимой для естественных врагов, поэтому скорость прохождения данной стадии напрямую будет влиять на выживаемость насекомых на фоне действия паразитов в природных биоценозах. В экспериментах № 3, 4, 5 при оценке продолжительности развития учитывался пол насекомых. Масса

куколок самок для ряда чешуекрылых, в том числе и непарного шелкопряда (Miller, 2005) напрямую коррелирует с количеством отложенных ими яиц, следовательно, может служить надежным и простым критерием для отображения потенциальной плодовитости насекомых. При оценке массы куколок во всех экспериментах учитывался пол насекомого.

Физиологические параметры защиты насекомых от паразитов, активность которых оценивалась в ходе экспериментов, будут описаны ниже, в ходе описания схем конкретных экспериментов.

2.2.1. Влияние **замедленной** индуцированной энтоморезистентности, вызванной **сильным** повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда, параметры иммунитета и чувствительность его к вирусу ядерного полиэдроза

Для моделирования замедленной индуцированной энтоморезистентности *B. pendula* за год до проведения основного эксперимента 20 деревьев были подвержены естественной дефолиации гусеницами непарного шелкопряда. Для ее достижения кроны берез полностью укрывали садками из капроновой мелкоячеистой сетки. Внутри каждого из них выпускали около 300 личинок непарного шелкопряда 3 возраста. После объедания ими не менее 75% листвы растения, садки снимали с деревьев вместе с насекомыми. Другие 20 деревьев укрывали сеткой без насекомых и использовали в качестве контроля.

На следующий год со всех сорока деревьев были собраны образцы листьев, по 50 шт. с дерева для химического анализа. Затем 20 из 40 деревьев (10 контрольных и 10 ранее дефолированных) использовали для выращивания насекомых. До 3 возраста насекомых содержали в лабораторных условиях на срезанных листьях экспериментальных деревьев. Затем их пересаживали в поле в садки-фонари на ветки опытных и

контрольных деревьев. На каждом из деревьев находилось по 3 садка. Насекомые из первого садка служили для определения показателей жизнеспособности. Эта группа насекомых выращивалась в естественных условиях до окукливания. Насекомые из второго садка служили для оценки следующих параметров иммунитета: лизоцим-подобной активности лимфы, интенсивности инкапсуляции в гемолимфе, активности фенолоксидазы в лимфе, концентрации гемоцитов в гемолимфе. Эти параметры оценивались у насекомых после достижения ими 4-го возраста. Третью группу гусениц из маленьких садков использовали для определения восприимчивости личинок 4-го возраста к инфицированию ВЯПД (см. главу 2.5). Эта группа (после заражения в лаборатории) оставалась в естественных условиях до окукливания.

2.2.2. Влияние **быстрой** индуцированной энтоморезистентности, вызванной **сильным** повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда и параметры его иммунитета

Индукцию энтоморезистентности в экспериментальных деревьях осуществляли, как и в первом эксперименте, с помощью 300 гусениц непарного шелкопряда третьего возраста, высаженных в большие садки, которыми полностью укрывались кроны берез. Однако внутри этих садков помещали другие два маленьких садка-фонаря из капроновой мелкоячеистой сетки. В последних садках содержали «опытных» насекомых, на которых оценивали влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности березы. Т.е, насекомые в маленьких садках-фонарях опытных деревьев находились под влиянием быстрого ответа растений, который индуцировался существенными повреждениями гусениц в больших садках. При этом происходила пространственная изоляция «опытных» насекомых от «дефолирующих». Насекомых в маленькие и большие садки высаживали

одновременно. Однако «дефолирующие» насекомые на момент высаживания были на один личиночный возраст старше («опытные» – во 2-м, тогда как «дефолирующие» – в 3-м), для более эффективной дефолиации кормового растения). Насекомых внутри одного из двух маленьких садков-фонарей выращивали в естественных условиях до окукливания. Они служили для определения показателей жизнеспособности *L. dispar*. Насекомых из второго маленького садка по достижению ими 4-го возраста перемещали в лабораторию и оценивали у них следующие показатели иммунитета: активность инкапсуляции гемолимфы, концентрацию гемоцитов в гемолимфе, фенолоксидазную активность лимфы, лизоцим-подобную активность лимфы.

В эксперименте участвовало 50 деревьев: 10 контрольных и 10 опытных – для содержания на них экспериментальных насекомых, другие 10 контрольных, 10 опытных и 10 интактных – для химического анализа листьев. Последние 10 деревьев использовались для оценки повреждений, которые наносили «опытные» насекомые, питающиеся на контрольных деревьях. Достоверных отличий в концентрации изучаемых вторичных метаболитов между контрольными и интактными деревьями обнаружено не было, поэтому эти выборки были в дальнейшем объединены для увеличения их репрезентативности.

Для химического анализа в этом эксперименте листья собирали дважды: перед посадкой насекомых и сразу после удаления «дефолирующих» насекомых с деревьев, т.е. на момент сильной степени дефолиации.

2.2.3. Влияние **быстрой** индуцированной энтоморезистентности, вызванной **сильным** повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда, физиологические параметры антибактериальной защиты и чувствительность его к бактериям *B. thuringiensis*

Для запуска в растениях индуцированной энтоморезистентности кроны 20 экспериментальных деревьев полностью укрывали большими сетками-садками, в 10 из которых выпускали 300 личинок 3-го возраста для дефолиации. Опытные насекомые (те, что в двух предыдущих экспериментах содержались на деревьях в маленьких садках-фонарях) в этом эксперименте на протяжении всего периода развития оставались в лабораторных условиях, где питались листьями с опытных и контрольных деревьев. Одна группа насекомых служила для определения показателей жизнеспособности. Другая – для оценки следующих параметров иммунитета: фагоцитарной активности гемолимфы, лизоцим-подобной активности лимфы, активности неспецифических эстераз в лимфе, лизоцим-подобной активности ткани среднего кишечника, протеолитической активности ткани и содержимого среднего кишечника. Эти параметры оценивали у насекомых после достижения ими 4-го возраста. Третью группу насекомых использовали для определения чувствительности личинок 4 возраста к заражению бактериями *B. thuringiensis*. Сравнение восприимчивости гусениц проводили по их выживаемости при заражении одинаковой дозой бактерий, а также по массе куколок и продолжительности развития личинок, выживших после заражения (см. главу 2.5).

2.2.4. Влияние **замедленной** индуцированной энтоморезистентности, вызванной **слабым** повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда, параметры иммунитета и зараженность его паразитоидами

За год до проведения основного эксперимента мы моделировали слабый уровень дефолиации личинками непарного шелкопряда, чтобы индуцировать замедленный ответ в березе. Для этого на две случайным образом выбранные ветки каждой из опытных берез надевали садки-фонари, внутрь которых выпускали по 30 личинок 2-го возраста. Деревья с двумя пустыми садками-фонарями были использованы в качестве контроля. Для этого эксперимента мы использовали 4 опытных и 4 контрольных дерева. Уровень дефолиации не превышал 5 %. Следующей весной мы использовали экспериментальные деревья для того, чтобы оценить эффект дефолиации предыдущего года кормовых растений на *L. dispar*. Для этого, в лабораторных условиях выращивали 3 группы личинок на листьях, срезанных с каждой из 8-ми берез. Первая группа насекомых служила для оценки их жизнеспособности. Вторая – для оценки следующих параметров иммунной системы: интенсивности инкапсуляции гемолимфы, фенолоксидазной активности лимфы, концентрации гемоцитов в гемолимфе. Третья – для определения фактической резистентности личинок к паразитоидам. Первые две группы насекомых содержали в лабораторных условиях весь период эксперимента. Личинок третьей группы по достижению 2-го возраста помещали в специальные садки и интродуцировали в экспериментальный колок для оценки уровня естественного паразитизма (см. главу 2.5).

2.2.5. Влияние **быстрой** индуцированной энтоморезистентности, вызванной **слабым** повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда, параметры иммунитета и зараженность его паразитоидами

Для осуществления слабого уровня (не более 5%) дефолиации *B. pendula* личинками *L. dispar* на две ветки, каждой из 5-ти «опытных» берез, надевали садки-фонари, внутрь которых выпускали по 30 личинок 2-го возраста. 5 деревьев с пустыми садками-фонарями были использованы в качестве контроля. Экспериментальных насекомых выращивали параллельно в лабораторных условиях на срезанных листьях с опытных и контрольных берез. Задержка в развитии опытных и «дефолирующих» насекомых составляла 1 возраст, с целью получения более выраженного ответа кормового растения. Часть насекомых использовали для оценки жизнеспособности, другую часть – для оценки параметров иммунной системы (интенсивности инкапсуляции гемолимфы, фенолоксидазной активности лимфы, концентрации гемоцитов в гемолимфе), третью – для определения фактической резистентности личинок к паразитоидам (см. главу 2.5).

2.3. Химический анализ листьев

В собранных с экспериментальных деревьев листьях были проанализированы три группы фенольных соединений: простые фенолы, водорастворимые гликозиды флавоноидов и липофильные агликоны флавоноидов. Для этого собранные образцы листьев высушили при комнатной температуре в тени в течение 10 дней. Затем листья размалывали для химической экстракции (Keinänen, Julkunen-Tiitto, 1996). Для экстракции простых фенолов и гликозидов флавоноидов, 20 мг порошка листьев

добавляли к 0,5 мл смеси ацетона и воды (7/3, v/v, 0,1% аскорбиновой кислоты, w/v) и перемешивали в течение 45 минут. Отцентрифугированные осадки были повторно экстрагированы дважды. Затем, ацетон из суммарного экстракта упаривали с помощью концентратора Eppendorf 5301 (Eppendorf, Germany). Оставшуюся водную часть экстрактов лиофилизировали. Высушенные экстракты повторно экстрагировали в 1,5 мл дистиллированной воды, отфильтровали и проанализировали с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа (ВЭЖХ, Merck-Hitachi, Japan), оснащенного обращено-фазовой колонкой и диодноматричным детектором. Для экстракции липофильных агликонов флавоноидов к 10 мг порошка листьев добавили 1 мл 95% этанола, экстрагировали 1 минуту, отцентрифугировали, отфильтровали супернатант, и проанализировали также с использованием ВЭЖХ системы (Lahtinen et al., 2006). Простые фенолы детектировали при 280 нм, флавоноиды – при 349 нм. Образцы, которые были представлены максимальным количеством пиков, дополнительно проанализировали на ВЭЖХ, с масс-спектрометрическим детектором (Salminen et al., 1999). Химические соединения идентифицировали на основе их ультрафиолетовых спектров, масс-спектров, а также времени выхода, описанного в литературе (Keinänen, Julkunen-Tiitto, 1998). Для определения концентрации простых фенолов использовали калибровочную кривую галловой кислоты, для флавоноидов – кверцетина.

Для определения концентрации летучих соединений в листьях экспериментальных деревьев пробоподготовку образцов провели по следующей схеме. Пробы листьев (70–100 г) взвешивали и экстрагировали 96%-ным этанолом (250 мл) методом настаивания при комнатной температуре в течение 72 ч. Спиртовые экстракты сконцентрировали до объема 5-10 мл на ротационном испарителе при комнатной температуре в вакууме водоструйного насоса. Полученный концентрат подвергали гидродистилляции с параллельной экстракцией петролейным эфиром (точка кипения 40–70°C), как описано у Ткачева (2008). Полученный раствор

летучих веществ в петролейном эфире осушали безводным сульфатом натрия, фильтровали от осушителя и концентрировали на ротационном вакуумном испарителе при комнатной температуре в вакууме водоструйного насоса. Хромато-масс-спектрометрические исследования проводили на газовом хроматографе HP 6890, оборудованном масс-селективным детектором HP 5972A. Компоненты экстрактов идентифицировали на основе индексов удерживания и масс-спектров (Ткачев, 2008).

Химический анализ фенолов проводился на базе лаборатории органической химии и химической биологии Университета Турку (Финляндия). Анализ летучих соединений проводили на базе лаборатории терпеновых соединений Новосибирского Института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН.

2.4. Активность защитных физиологических параметров непарного шелкопряда против паразитов

Определение активности инкапсуляции гемолимфы

Для определения активности инкапсуляции гемолимфы в гемоцель насекомого, через прокол в кутикуле, погружали нейлоновый имплантат длиной 2 мм. Его инкубировали в организме насекомого 3 часа, после чего извлекали и делали цифровую фотографию инкапсулированного имплантата с трех сторон. Степень потемнения (меланизации) имплантата определяли с помощью компьютерной программы Image J (Rantala, Roff, 2007). Результат представлен как разница в степени потемнения экспериментального и контрольного (не погруженного в гемоцель насекомого) имплантатов, выраженная в условных единицах компьютерной программы.



Рис. 1 Нейлоновый имплантат, инкапсулированный в гемоцеле насекомого.

Выделение гемолимфы насекомых

Гемолимфу личинок отбирали пипеткой через прокол в кутикуле и немедленно помещали ее в охлажденные пластиковые пробирки. Часть гемолимфы использовали для анализа форменных элементов. Другую часть освобождали от гемоцитов центрифугированием. Если полученную лимфу не использовали для определения активности фенолоксидазы, в нее добавляли кристалл фенилтиомочевины для предотвращения меланизации образца.

Определение концентрации гемоцитов в гемолимфе

Количество гемоцитов определяли в камере Горяева при помощи светового микроскопа (Lee et al., 2006). Предварительно гемолимфу (5 мкл) смешивали с антикоагулянтом (10 мкл) (62 мМ хлорид натрия, 100 мМ глюкоза, 10 мМ ЭДТА, 30 мМ цитрат натрия, 26 мМ лимонная кислота, рН 4,6) и фенилтиомочевинной (насыщали раствор добавлением кристаллов). Полученную концентрацию гемоцитов пересчитывали на 1 мл гемолимфы насекомого.

Определение фенолоксидазной активности лимфы

Фенолоксидазную активность лимфы определяли спектрофотометрически, используя L-дигидроксифенилаланин (Sigma, США)

в качестве субстрата (Kryukova et al., 2011). Для этого 10 мкл лимфы инкубировали с 500 мкл раствора субстрата в фосфатном буфере, рН 7,2 (концентрация 2 мг/мл) в течение 1 часа при 28 °С. Детекцию продукта осуществляли при 490 нм. Относительную активность фермента выражали как изменение оптической плотности образца в минуту на 1 мг белка.

Определение лизоцим-подобной активности лимфы

Лизоцим-подобную активность оценивали луночным методом на культуре бактерий *Micrococcus lysodeikticus* по размеру зон лизиса (Lee et al., 2006). В экспериментах №1 и №2 использовали только живую культуру, в эксперименте №3 - живую культуру и лиофилизированный *M. lysodeikticus*. Инкубацию проводили в течение 24 часов при 28⁰С. Затем литическую зону каждого образца фотографировали цифровой камерой, площадь зоны определяли с помощью компьютерной программы Image J. Для определения активности фермента использовали калибровочную кривую на основе коммерческого лизоцима (Sigma, США).



Рис. 2 Зоны лизиса на культуре бактерий *M. lysodeikticus*.

Определение фагоцитарной активности гемолимфы

Активность фагоцитоза определяли с помощью меченых флуоресцеинизотиоцианатом клеток *Escherichia coli* (Dubovskiy et al., 2008). Бактериальные клетки инъецировали в гемоцель насекомым (10^6 клеток

бактерий на личинку). Инкубировали 1 час, выделяли гемолимфу, отмывали гемоциты от лимфы центрифугированием в антикоагулянте, затем клетки ресуспендировали в HEPES буфере (10 mM, pH 7,2, 140 mM хлорид натрия, 5 mM хлорид калия, 6 mM глюкоза). Далее гемоциты наносили на чистое стекло и помещали во влажную камеру на 15 минут в темноту при 28⁰С. После инкубации полученный монослой клеток фиксировали 0,25% глутаровым альдегидом в HEPES буфере в течение 10 минут во влажной камере в темноте при 28⁰С. Для гашения внеклеточного свечения бактерий на монослой гемоцитов наносили 0,25% раствор трипанового синего и анализировали монослой в световом микроскопе под люминесценцией (Axioscop 40, Zeiss, Germany). Активность фагоцитоза выражали как процент гемоцитов, содержащих меченые бактериальные клетки, от общего количества гемоцитов.

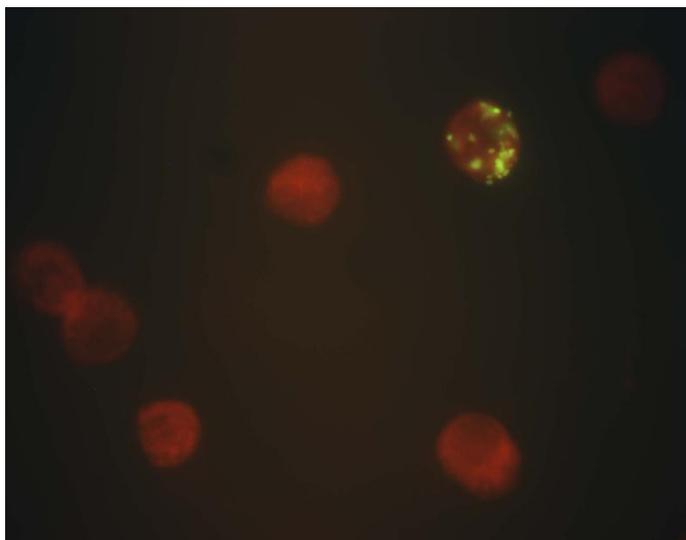


Рис. 3 Гемоциты с фагоцитированными бактериями и без них. Увеличение $\times 1000$.

Определение активности неспецифических эстераз в лимфе

Активность неспецифических эстераз определяли спектрофотометрически (Серебров, 2000). Реакционная смесь содержала 200 мкл 0,54 mM p-нитрофенилацетата в фосфатном буфере и 5 мкл лимфы.

Смесь инкубировалась 25 мин в темноте при 28°C. Оптическую плотность определяли при 410 нм. Результат представлен как изменение оптической плотности образца в минуту на 1 мг белка.

Выделение среднего кишечника насекомого и его содержимого, приготовление гомогенатов

Для приготовления гомогенатов среднего кишечника гусениц насекомых препарировали в 0,1 М натрий-фосфатном буфере pH 7,2 с 0,15 М NaCl. Отдельно извлекали ткань среднего кишечника, отдельно его содержимое с перитрофической мембраной. Препарированный кишечник тщательно очищали от трахей, мальпигиевых сосудов, промывали и гомогенизировали ультразвуком в 100 мкл охлажденного фосфатного буфера (для определения лизоцим-подобной активности ткани среднего кишечника) или в 100 мкл Tris-HCl, pH 8 (для определения активности протеолитических ферментов среднего кишечника). Содержимое просвета кишечника гомогенизировали в 150 мкл Tris-HCl, pH 8 (только для определения активности протеолитических ферментов). Гомогенаты центрифугировали 10 мин 20000 g при 4°C. Полученные супернатанты использовали для определения ферментативной активности протеиназ.

Определение лизоцим-подобной активности ткани среднего кишечника

Определение проводили тем же способом, что и для лимфы (см. выше) с использованием лиофилизированного *M. lysodeikticus*.

Определение активности протеолитических ферментов в ткани среднего кишечника и его содержимом

Общую активность щелочных протеиназ определяли спектрофотометрически по скорости гидролиза азоказеина (Hegedus et al., 2003). Для этого 18 мкл гомогената добавляли к 140 мкл 0,3% азоказеина в 0,1 М Tris-HCl буфере, pH 8 и инкубировали при температуре 28°C в течение

20 мин. Реакцию останавливали добавлением 40 мкл 30% трихлоруксусной кислоты и инкубированием на льду. Затем образец центрифугировали 10 мин при 20000 g. К 120 мкл супернатанта добавляли 60 мкл 1М NaOH. Оптическую плотность определяли при 440 нм. Результат представлен как изменение оптической плотности образца в минуту на 1 мг белка.

Типирование протеиназ

Для определения активности различных групп протеиназ использовали спектрофотометрический метод определения активности ферментов с преинкубацией образцов с ингибиторами в течение 30 мин. Для подавления активности группы сериновых протеиназ использовали PMSF (фенилметилсульфонилфлуорид, концентрация в образце 2 мМ). Для ингибирования активности металлопротеаз использовали ЭДТА (натриевую соль этилдиаминтетрауксусной кислоты, концентрация в образце 2 мМ). После преинкубации процедуру определения активности протеолитических ферментов проводили в соответствии с вышеописанной методикой. Результат представлен как процент ингибируемой активности образца от общей его активности.

Количественное определение белка

Концентрацию белка в гемолимфе определяли по методу М. Бредфорда (Bradford, 1976). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин (Sigma, США).

2.5. Заражение насекомых и оценка их чувствительности к паразитам

Для экспериментального заражения использовали штамм вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда №25 из коллекции музея лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН. Данный штамм был

выделен из природной популяции непарного шелкопряда в одном из очагов его массового размножения в Алтайском крае. Инфицирование насекомых проводили в 4-ом личиночном возрасте, перорально. Водную суспензию полиэдров вируса наносили на поверхность листьев путем мелкодисперсного опрыскивания, корм подсушивали в темноте при комнатной температуре и в последующем предлагали насекомым. Титр суспензии вируса составлял 10^7 полиэдров/мл. Обработка корма проводилась на рамке 50x50 см, из расчета 50 мл суспензии на данную площадь. Количество размещенных на рамке побегов приблизительно соответствовало плотности кроны березы растущей в естественных условиях. Листья для контрольных насекомых обрабатывали водой. Смена корма после заражения осуществлялась только после полного поедания инфицированного (в течение 2 дней). В дальнейшем оценивали выживаемость насекомых до половозрелой стадии.

Для экспериментального заражения бактериями использовали штамм *Bacillus thuringiensis* 2127, из коллекции музея лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН, выделенный из гусениц американской белой бабочки. Инфицирование насекомых проводили в 4-ом возрасте, перорально. Водную суспензию споро-кристаллической смеси (концентрации $2,5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл и $5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл) наносили на поверхность листьев кисточкой. Из расчета 5 мл суспензии на 50 листьев. Листья подсушивали при комнатной температуре, в тени, и скармливали насекомым. Листья для контрольных насекомых обрабатывали водой. В дальнейшем оценивали выживаемость насекомых до стадии куколки, массу куколок и продолжительность развития личиночной стадии выживших насекомых.

Для оценки чувствительности личинок непарного шелкопряда к заражению паразитоидами, по достижению 2-го возраста их интродуцировали в березовый колок в контейнерах с открытым верхом. Контейнер был прикреплен в средней части кроны к стволам интактных берез, удаленных от экспериментальных деревьев. Таким образом, была

исключена эмиссия аттрактивных соединений повреждаемыми деревьями, которые потенциально могли привлечь паразитоидов. Поэтому, в данном случае, взаимодействие с паразитоидами изменялось только при изменении защитных реакций хозяина. Обнаруженных при ежедневном наблюдении личинок шелкопряда с сформированными паразитическими коконами, а также погибших насекомых транспортировали в лабораторию и размещали в индивидуальных пластиковых контейнерах для выведения имаго паразитоида. В случае хищничества, вместе с погибшими гусеницами шелкопряда извлекался и хищник (жужелицы, верблюдки). Уровень паразитизма был оценен как процент пораженных/съеденных личинок по отношению к их общему числу.

Видовое определение беспозвоночных хищников и паразитоидов осуществлялось совместно со следующими специалистами: Антон Гаврилюк и Сергей Александрович Белокобыльский (перепончатокрылые), Вера Сергеевна Сорокина и Вера Андреевна Рихтер (двукрылые), Роман Дудко (жесткокрылые).

2.6. Статистическая обработка данных

Все данные были проверены на нормальное распределение тестом Колмагорова-Смирнова (Statistica 6.0). При отклонении от нормального распределения для последующей статистической обработки данные логарифмировали (десятичный логарифм) и повторно проверяли тем же методом.

Результаты, представленные в диссертации, опубликованы в разное время и в разных статьях, поэтому выбор методов для статистической обработки данных незначительно отличается от эксперимента к эксперименту, при одинаковых схемах с целью полного соответствия публикациям (Martemyanov et al., 2012a,b, 2013). При статистической

обработке данных одинаковыми методами достоверность отличий сохранялась.

2.6.1. Влияние **замедленной** индуцированной энтоморезистентности, вызванной **сильным** повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда, параметры иммунитета и чувствительность его к вирусу ядерного полиэдроза

Достоверность различий концентраций вторичных метаболитов между вариантами оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA, Statistica 6.0). Для показателей жизнеспособности (кроме смертности) и иммунитета использовали смешанную модель (Mixed Model Analysis) учитывающую влияние «учтенного» и «случайного» факторов с последующим попарным сравнением LSD-тестом (SPSS 17.0). При статистической обработке данных массы куколок насекомых, в этом анализе «учтенными» факторами были: «индуцированная резистентность» и «пол куколок», случайным – деревья, на которых выращивались насекомые. При статистической обработке данных по продолжительности развития личинок и активности иммунитета, «учтенным» фактором была «индуцированная резистентность», «случайным» – «дерево». Достоверность различий между данными о выживаемости насекомых оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа («индуцированная резистентность» и «заражение вирусом») (Two-way ANOVA, Statistica 6.0) с предварительным преобразованием в $\arcsin(\sqrt{\%/100}) * 180/\pi$.

Для оценки взаимосвязи между состоянием показателей иммунитета и выживаемостью насекомых после заражения использовали корреляционный анализ Пирсона, основанный на сравнении значений, на каждом изучаемом дереве.

2.6.2. Влияние **быстрой** индуцированной энтоморезистентности, вызванной **сильным** повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда и параметры его иммунитета

Достоверность различий концентраций вторичных метаболитов между вариантами оценивали с помощью дисперсионного анализа с повторяющимися измерениями (Repeated Measures ANOVA, SPSS 11.5.1). Это связано с тем, что листья березы отбирались дважды в течение сезона. Достоверность различий между вариантами параметров жизнеспособности и иммунных параметров оценивали с помощью гнездового дисперсионного анализа (Nested design ANOVA, Statistica 6.0); данные параметров жизнеспособности были предварительно разделены на группы по полу. Достоверность различий смертности оценивали однофакторным дисперсионным анализом (Statistica 6.0) с предварительным преобразованием в $\arcsin(\sqrt{\%/100}) \cdot 180/\pi$.

2.6.3. Влияние **быстрой** индуцированной энтоморезистентности, вызванной **сильным** повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда, физиологические параметры антибактериальной защиты и чувствительность его к бактериям *B.*

thuringiensis

Достоверность различий показателей жизнеспособности (кроме смертности) и иммунитета между вариантами оценивали с помощью смешанной модели с последующим по парным сравнением LSD-тестом (SPSS 17.0). При статистической обработке данных веса куколок и времени развития насекомых, в этом анализе «учтенными» факторами были: «индуцированная резистентность» и «пол насекомых», «случайным» – «дерево». При оценке этих же показателей в эксперименте с заражением

бактериями «учтенными» факторами были «индуцированная резистентность» и «заражение», а случайным – «дерево». Куколки разного пола анализировались отдельно. При статистической обработке данных физиологических параметров, «учтенным» фактором была «индуцированная резистентность», «случайным» – «дерево». Достоверность различий между данными о выживаемости оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (Statistica 6.0) (факторы: «индуцированная резистентность» и «заражение бактериями») с предварительным преобразованием в $\arcsin(\sqrt{\%/100}) * 180/\pi$.

2.6.4. Влияние замедленной и быстрой индуцированной энтоморезистентности, вызванной **слабым** повреждением кормового растения, на жизнеспособность непарного шелкопряда, параметры иммунитета и зараженность его паразитоидами

Достоверность различий показателей жизнеспособности (кроме смертности) и иммунитета между вариантами оценивали с помощью смешанной модели с последующим по парным сравнением LSD-тестом (SPSS 17.0). При статистической обработке данных в этом анализе «учтенными» факторами были: «индуцированная резистентность» и «пол насекомых», «случайным» – «дерево». Достоверность различий между данными о выживаемости оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (Statistica 6.0) с предварительным преобразованием в $\arcsin(\sqrt{\%/100}) * 180/\pi$.

Глава 3. ВЛИЯНИЕ **ЗАМЕДЛЕННОЙ** ИНДУЦИРОВАННОЙ
ЭНТОМОРЕЗИСТЕНТНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ **СИЛЬНЫМ**
ПОВРЕЖДЕНИЕМ КОРМОВОГО РАСТЕНИЯ, НА
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА, ПАРАМЕТРЫ
ИММУНИТЕТА И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЕГО К ВИРУСУ ЯДЕРНОГО
ПОЛИЭДРОЗА

В ходе эксперимента по влиянию замедленной индуцированной энтоморезистентности на непарного шелкопряда, не было получено достоверного изменения выживаемости личинок ($F=0,520$; $P=0,476$) (рис. 4) и массы куколок *L. dispar* ($F=1,646$; $P=0,219$) (рис. 5) при питании их на опытных деревьях по сравнению с личинками, питающихся на контрольных деревьях. В тоже время было получено увеличение времени развития личинок под действием замедленной индуцированной энтоморезистентности кормового растения ($F=15,9$; $P=0,001$) (рис. 6). Такой же эффект был показан и для *E. autumnata* в случае, когда резистентность горной березы была вызвана как искусственными повреждениями так и при естественной дефолиации гусеницами (Mutikainen et al., 2000, Ruuhola et al., 2007). Увеличение продолжительности развития насекомых потенциально может негативно сказаться на популяции, поскольку с увеличением времени развития увеличивается и вероятность встречи их с естественными врагами, которые постоянно присутствуют в биотопе.

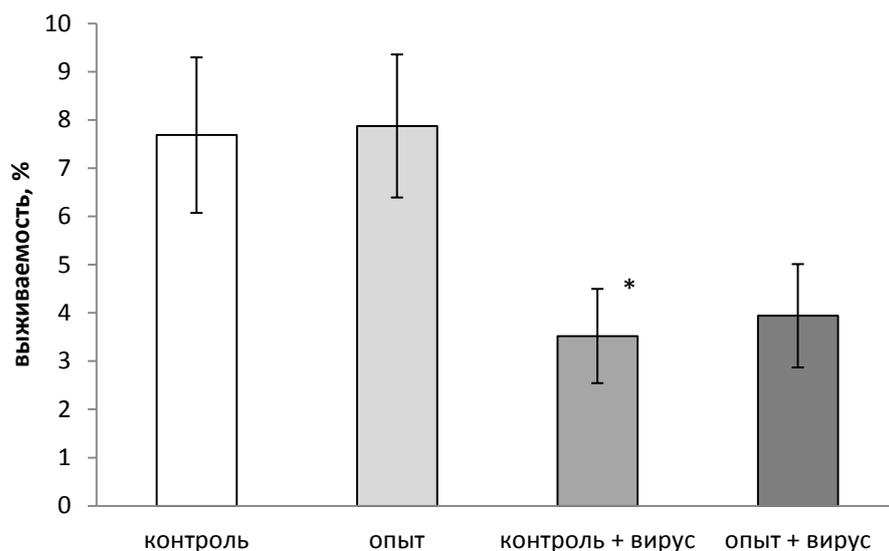


Рис. 4 Влияние замедленной индуцированной энторморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на общую выживаемость и чувствительность к вирусу *L. dispar* (* при $P < 0,05$ по сравнению с «контролем»).

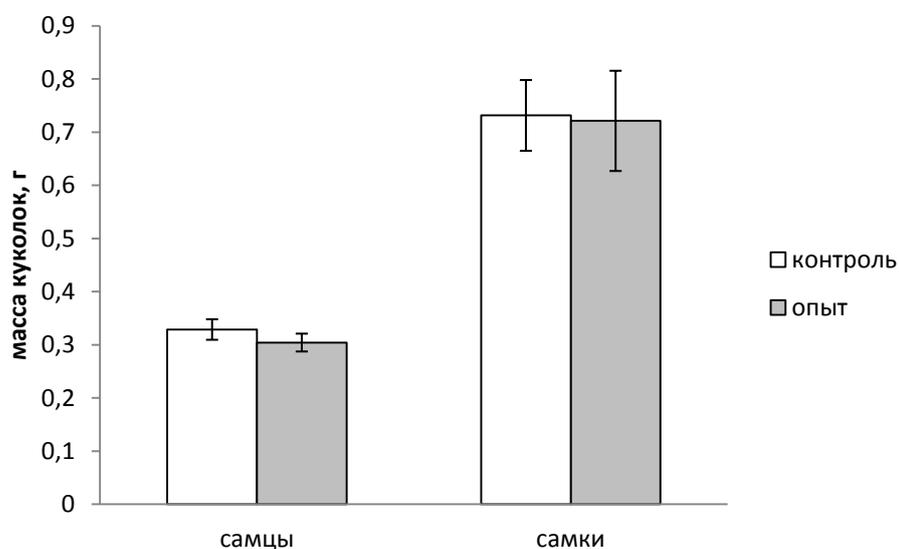


Рис. 5 Влияние замедленной индуцированной энторморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на массу куколок *L. dispar*.

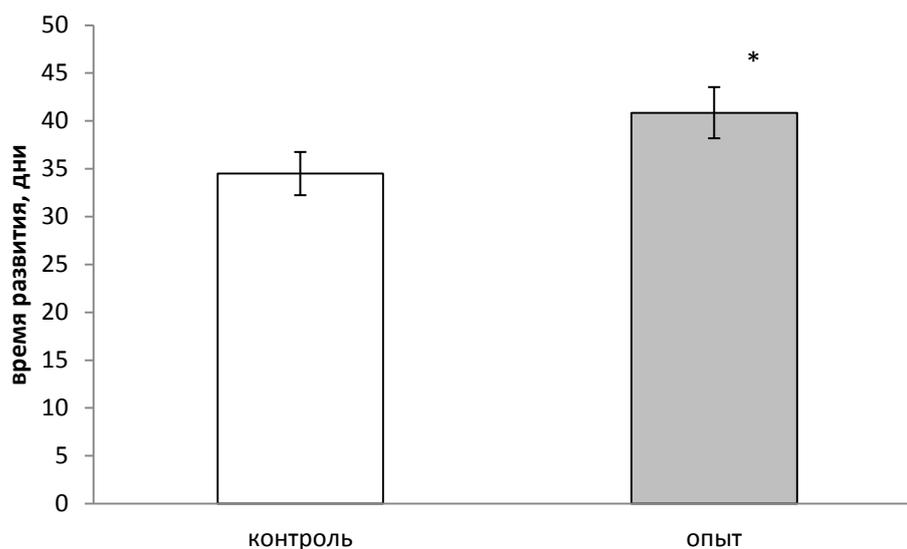


Рис. 6 Влияние замедленной индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на время развития личиночной стадии *L. dispar* (* при $P < 0,05$).

В результате питания на поврежденных ранее растениях у личинок не изменялись активность инкапсуляции нейлонового имплантата личинок ($F=0,025$; $P=0,878$) (рис. 7), фенолоксидазная активность лимфы ($F=3,63$; $P=0,077$) (рис. 8), концентрация гемоцитов в гемолимфе ($F=2,09$; $P=0,172$) (рис. 9). В тоже время было показано увеличение антибактериальной активности лимфы гусениц, питающихся на ранее поврежденных растениях по сравнению с насекомыми, питающимися на контрольных деревьях ($F=51,4$; $P < 0,001$) (рис. 10). В совокупности с результатом, демонстрирующим увеличение времени развития личинок при воздействии замедленного ответа березы, это результат согласуется с исследованием Rantala, Roff (2005), которые показали положительную корреляцию между этими двумя показателями для *Gryllus bimaculatus*. При увеличении времени развития насекомого и, соответственно вероятности встречи его с естественными врагами, вклад ресурсов в увеличение резистентности против паразитов повышает шансы насекомого на выживание. В условиях роста численности фитофагов в естественных условиях такие явления обычно связывают либо с низкой питательной ценностью пищевого ресурса, либо с

эффектом скученности. Стоит отметить, что данный феномен, вероятно, не связан с содержанием белков в пище. Поскольку при проявлениях индуцированной резистентности растений регистрируется снижение содержания белков в листьях (Kaitaniemi et al., 1998), а увеличение антибактериальной активности коррелирует с высоким их содержанием в корме (Lee et al., 2006).

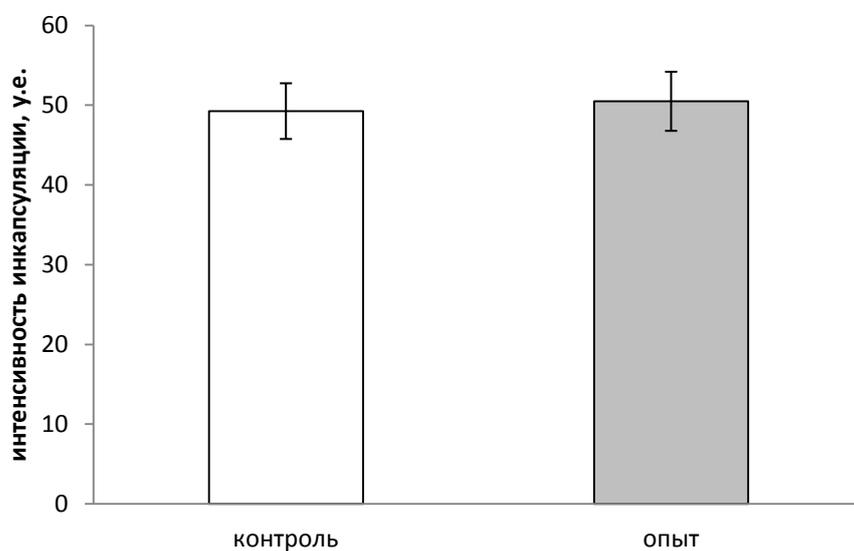


Рис. 7 Влияние замедленной индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на активность инкапсуляции нейлонового имплантата в лимфе *L. dispar*.

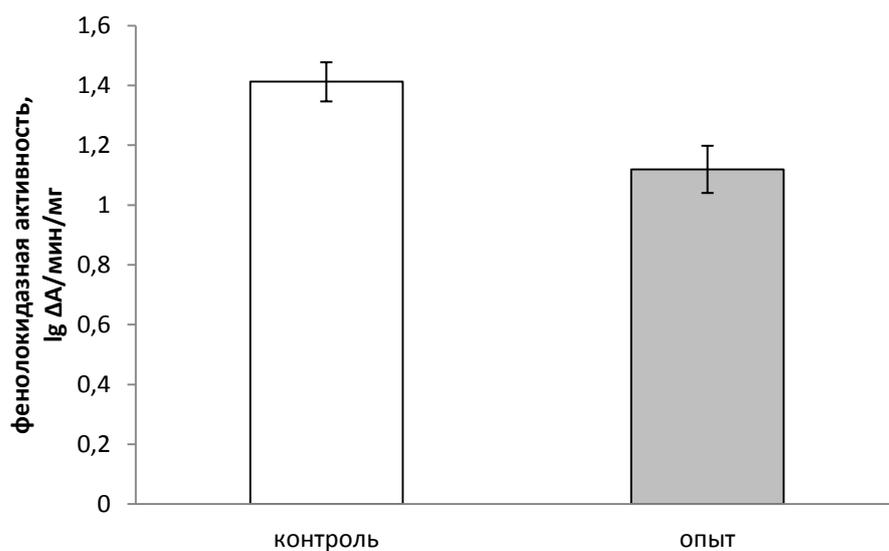


Рис. 8 Влияние замедленной индуцированной энтومорезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на фенолоксидазную активность лимфы *L. dispar*.

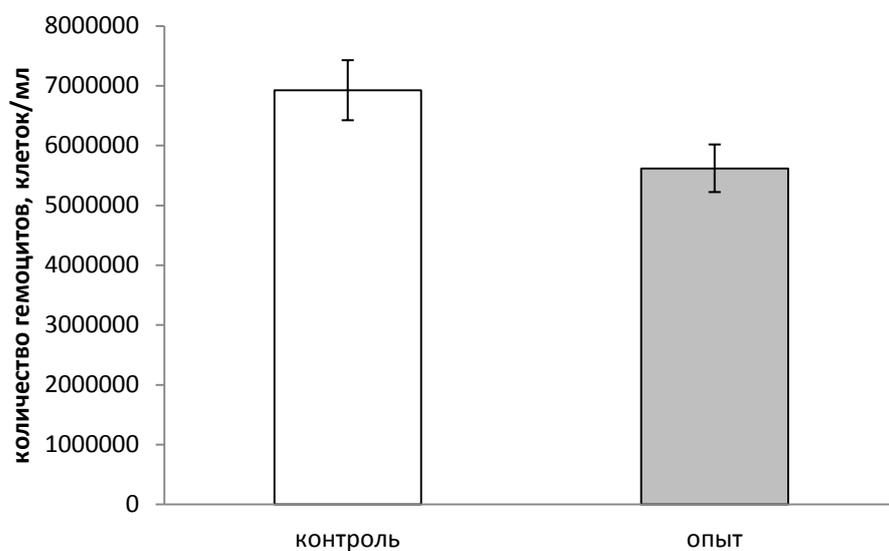


Рис. 9 Влияние замедленной индуцированной энтومорезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на концентрацию гемоцитов в гемолимфе *L. dispar*.

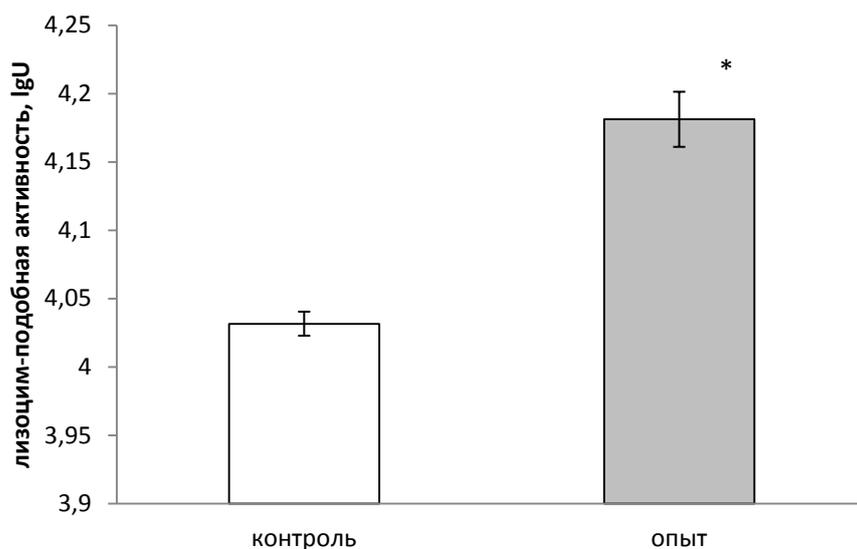


Рис. 10 Влияние замедленной индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на лизоцим-подобную активность лимфы *L. dispar* (* при $P < 0,05$).

Что касается влияния замедленной индуцированной энтоморезистентности кормового растения на чувствительность личинок к вирусу ядерного полиэдроза, его обнаружено не было ($F=0,120$; $P=0,730$) (рис. 4). Ранее при моделировании замедленной индуцированной резистентности березы, вызванной искусственными повреждениями, также было показано, что общая смертность гусениц от вируса не изменяется (Мартемьянов и др., 2009). В то время как в работе Hunter, Schultz (1993), при изучении влияния индуцированной резистентности дуба *Quercus rubra* на *L. dispar* было показано снижение чувствительности к вирусу личинок, питающихся на поврежденных растениях. Вероятно, индуцированный ответ разных видов деревьев может по-разному влиять на взаимоотношения между фитофагом и паразитами.

Стоит также отметить, что в результате проведенного эксперимента была показана положительная корреляция между концентрацией гемоцитов в гемолифе личинок и выживаемостью их от вируса ($r=0,57$; $P=0,02$). Это согласуется с исследованием, показавшем ведущую роль гемоцитов при

формировании антивирусного ответа чешуекрылых (Trudeau, Washburn, Volkman, 2001).

Существенное объедание деревьев *B. pendula* в предыдущем вегетационном сезоне привело к достоверному увеличению в их листьях одного простого фенола («неидентифицированный фенол №1»: $F=11,68$; $P=0,002$), одного гликозида флавоноида (гликозид мирицетина: $F=6,58$; $P=0,014$) и двух агликонов флавоноидов (акацетин: $F=8,365$; $P=0,007$; тетрагидроксифлавонодиметилэфир: $F=6,69$; $P=0,014$). В тоже время концентрация трех гликозидов флавоноидов значительно снизились после дефолиации (рис. 11) (гликозид кверцетина №1: $F=4,7$; $P=0,036$; гликозид кверцетина №2 $F=4,79$, $P=0,009$; «неидентифицированный гликозид флавоноида №1»: $F=4,92$; $P=0,037$). Т.е. концентрация трех из регистрируемых гликозидов флавоноидов была ниже, а концентрация двух агликонов флавоноидов выше в опытных деревьях, по сравнению с контрольными растениями. Известно, что агликоны флавоноидов обладают более высокой цитотоксичностью по сравнению с гликозидами (Запрометов, 1993; Meselhy, Hammad, Farag, 2012). Кроме того, увеличение концентрации агликонов флавоноидов в корме может привести к снижению его питательной ценности вследствие связывания агликонами белков пищи, т.к. известно, что агликоны фенольных соединений обладают большей связывающей способностью по сравнению с гликозилированными формами (Сао et al. 2009). В работе Мартемьянова с соавторами (2014, в печати) показано, что смывание с поверхности листьев березы поверхностных липофильных соединений (составляющей частью которых являются агликоны флавоноидов) приводит к увеличению массы и скорости развития непарного шелкопряда, питающегося этими листьями. Добавление поверхностных липофильных соединений в искусственную питательную среду приводит к увеличению смертности и снижению массы *L. dispar*.

В механизмах замедленной индуцированной энтоморезистентности вероятно играет роль и мирицитин, концентрация которого увеличилась в березе в ответ на дефолиацию. Ранее Mutikainen с соавторами (2000) показали наличие отрицательной корреляции между содержанием этого флавоноида в листьях *B. pendula* и массой куколок, питающихся на них *E. autumnata*. Оба этих результата косвенно указывают на участие мирицетина в механизмах индуцированной энтоморезистентности березы.

Эти результаты во многом открывают новую сторону в изучении ответа деревьев индуцированного существенной дефолиацией листогрызущими насекомыми. Т.к. при изучении защитных механизмов и роли в них фенолов большинство исследователей сосредоточены на изучении высокомолекулярных фенолов (танинов) (Hanter, Schultz, 1993; Ojala et al., 2005; Ruuhola et al., 2007; Varbehenn, Constabel, 2011). Однако в нашем случае оценка концентрации танинов при дефолиации была не актуальной. При изучении прямого влияния этой группы фенолов на непарного шелкопряда показана его низкая чувствительность к этим соединениям (Osier, Lindroth, 2001; Martemyanov et al., 2006; Varbehenn et al., 2009a, b).

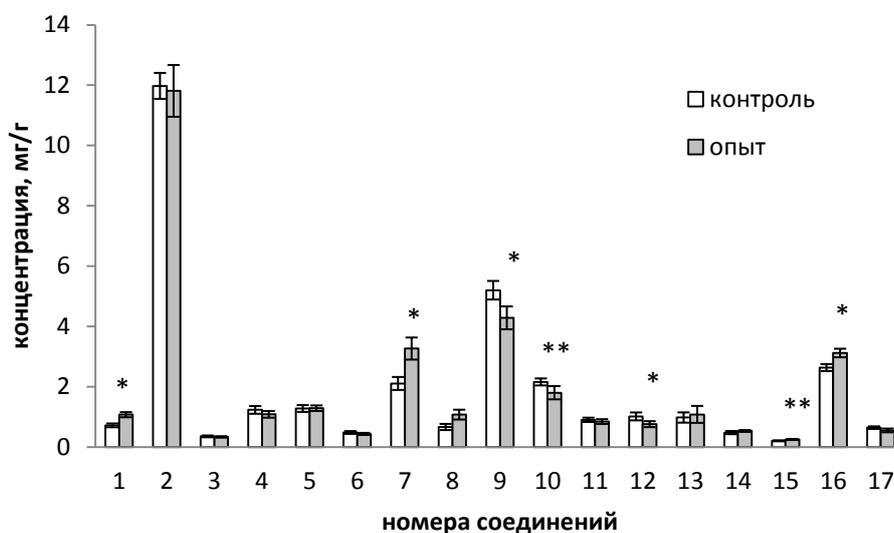


Рис. 11 Содержание фенольных соединений в листьях контрольных деревьев *B. pendula* и деревьев, подвергшихся сильному повреждению личинками *L. dispar* в предыдущем вегетационном сезоне (*при $P < 0,05$; **при $P < 0,01$): 1 – 6 простые фенолы (1 – неидентифицированный фенол №1, 2 – 1-(4-гидроксифенил)-3-оксопропил- β -D-глюкопираноза, 3 – неидентифицированный фенол №2, 4 – хлорогеновая кислота, 5 – производная кумароил-хинной кислоты №1, 6 – производная кумароил-хинной кислоты №2); 7 – 13 водорастворимые гликозиды флавоноидов (7 – гликозид мирицетина, 8 – гликозид кверцетина №1, 9 – гликозид кверцетина №2, 10 – гликозид кверцетина №3, 11 – гликозид кверцетина №4, 12 – гликозид неидентифицированного флавоноида №1, 13 – гликозид неидентифицированного флавоноида №2); 14 – 17 липофильные агликоны флавоноидов (14 – агликон флавоноида, 15 – акацетин, 16 – тетрагидроксифлавоидиметилэфир, 17 – пентагидроксифлавоид).

В результате проведенного эксперимента было также установлено, что концентрация летучих соединений в листьях опытных и контрольных деревьев достоверно не отличается (рис. 12). Вероятно, они не играют роли в долговременной защите березы от фитофагов.

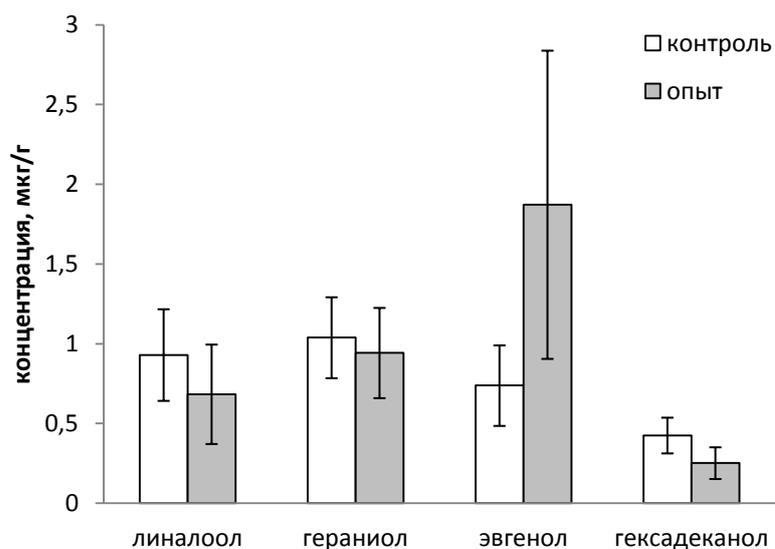


Рис. 12 Содержание летучих соединений в листьях контрольных деревьев *B. pendula* и деревьев, подвергшихся сильному повреждению личинками *L. dispar* в предыдущем вегетационном сезоне.

Глава 4. ВЛИЯНИЕ **БЫСТРОЙ** ИНДУЦИРОВАННОЙ
ЭНТОМОРЕЗИСТЕНТНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ **СИЛЬНЫМ**
ПОВРЕЖДЕНИЕМ КОРМОВОГО РАСТЕНИЯ, НА
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА И ПАРАМЕТРЫ
ЕГО ИММУНИТЕТА

При питании на листьях, поврежденных в этом же году растений, у личинок непарного шелкопряда увеличивается смертность ($F=7,875$; $p=0.012$) (рис. 13) и время развития личинок самок ($F=10.27$; $p=0.005$) (рис. 14), снижается масса куколок самок ($F=9.839$; $p=0.007$) (рис. 15). В разных исследуемых системах «растение-фитофаг» и в зависимости от вида исследуемого повреждения (искусственные, естественные) эффекты индуцированной резистентности на жизнеспособность насекомых могут проявляться по-разному. Так, в работе Mutikainen с соавторами (2000) при воздействии резистентности березы, индуцированной искусственной дефолиацией, увеличивалось время развития личинок *E. autumnata*, масса куколок не изменялась. В исследовании Roden, Mattson (2008) – снижалась масса куколок самок *L. dispar*, в то время как не изменялось время развития личинок. Следует отметить, что влияние быстрой индуцированной резистентности на массу куколок только самок шелкопряда может быть обусловлено различиями в усвоении питательных веществ гусеницами разных полов *L. dispar* (Stockhoff, 1993).

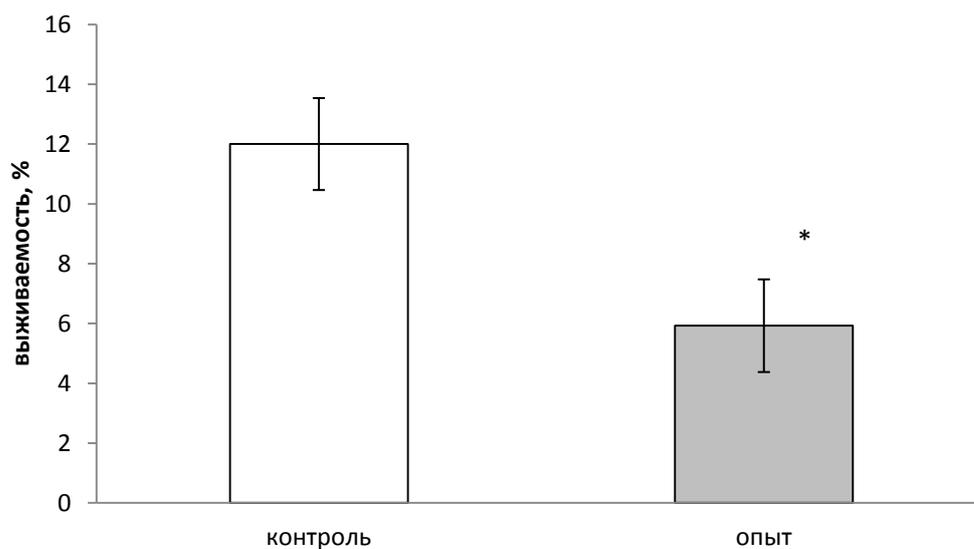


Рис. 13 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на выживаемость *L. dispar* (* при $P < 0,05$).

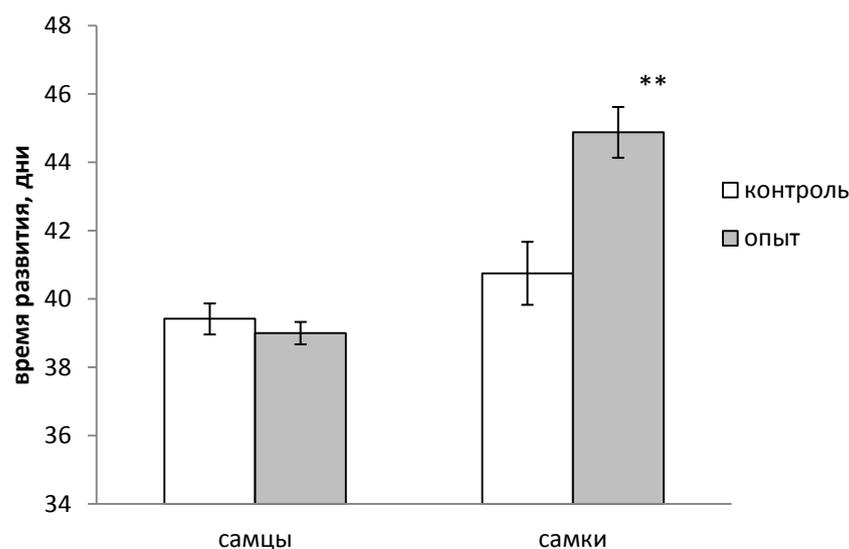


Рис. 14 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на время развития личиночной стадии *L. dispar* (** при $P < 0,01$).

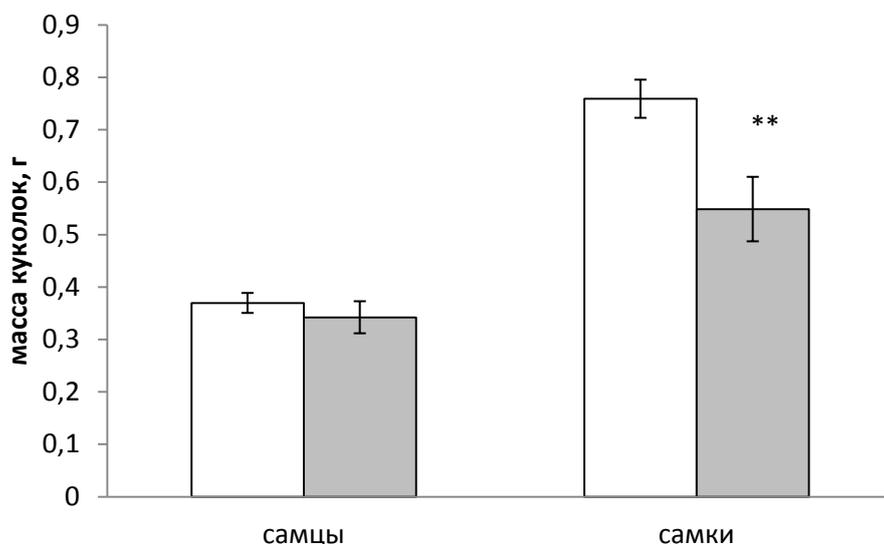


Рис. 15 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на массу куколок *L. dispar* (**при $P < 0,01$).

В результате питания на поврежденных в текущем вегетационном сезоне растениях у личинок достоверно не изменялись активность инкапсуляции ($F=3,85$; $P=0,06$) (рис. 16), фенолоксидазная активность лимфы ($F=2,22$; $P=0,143$) (рис. 17) и концентрация гемоцитов в гемолимфе ($F=0,95$; $P=0,336$) (рис. 18). Однако при изучении влияния быстрого индуцированного ответа березы было получено увеличение лизоцим-подобной активности лимфы у личинок, питающихся на поврежденных растениях по сравнению с лимфой личинок, питающихся на контрольных деревьях ($F=7,83$; $P=0,008$) (рис. 19). Кроме того, используемый в эксперименте метод статистической обработки данных (Nested ANOVA) позволил продемонстрировать существенное влияние индивидуальных особенностей деревьев на показатели иммунитета насекомых, в частности, на активность инкапсуляции ($F=2,18$; $P=0,009$). И если для показателей жизнеспособности насекомых подобные эффекты были показаны и раньше (Laitinen, Julkunen-Tiitto, 2000; Naviola et al., 2007), то для иммунных параметров это было показано впервые. Вероятно, это связано с высокой внутривидовой вариабельностью

берез по химическому составу вследствие их генетического разнообразия (Laitinen, Julkunen-Tiitto, 2000). Тот факт, что иммунологические параметры насекомых в значительной степени зависят от индивидуальных особенностей кормовых растений, согласуется с тем фактом, что вирусные эпизоотии обычно возникают в популяциях *L. dispar* в отдельных колках (в лесостепи Западной Сибири деревья в колке обычно являются вегетативными клонами), а не повсеместно.

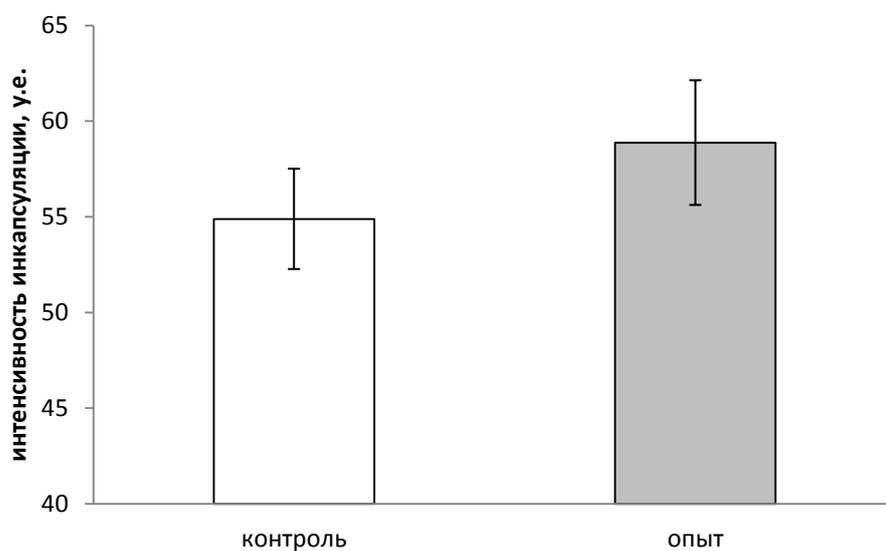


Рис. 16 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на активность инкапсуляции нейлонового имплантата в лимфе *L. dispar*

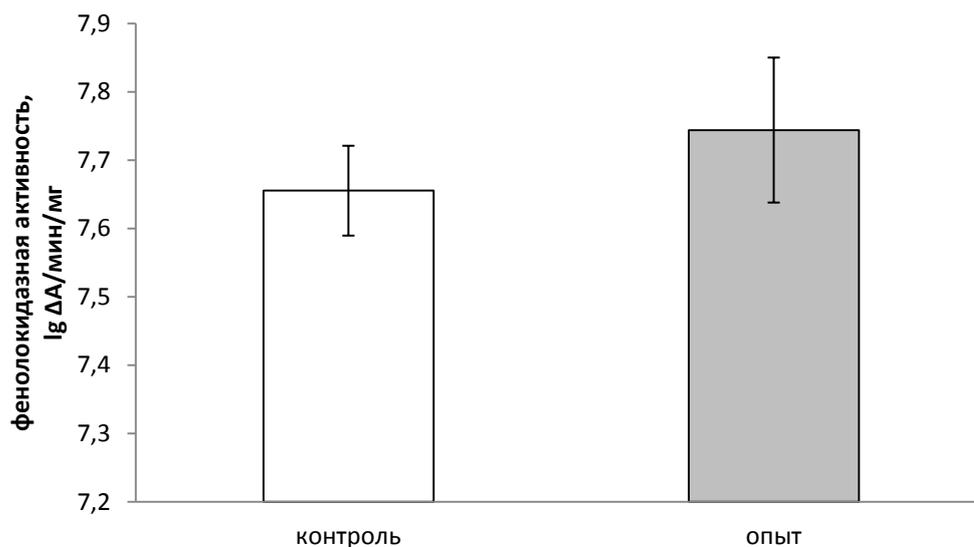


Рис. 17 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на фенолоксидазную активность лимфы *L. dispar*.

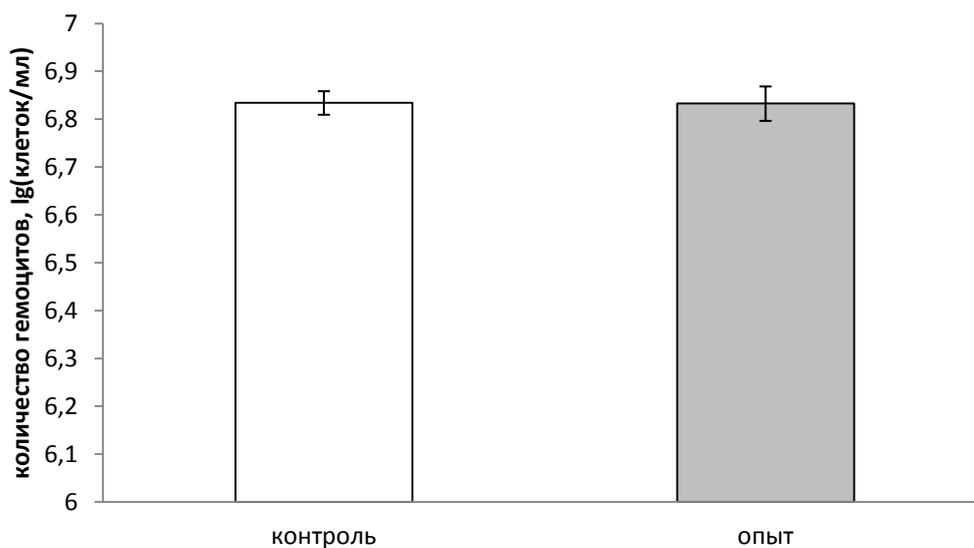


Рис. 18 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на концентрацию гемоцитов в гемолимфе *L. dispar*.

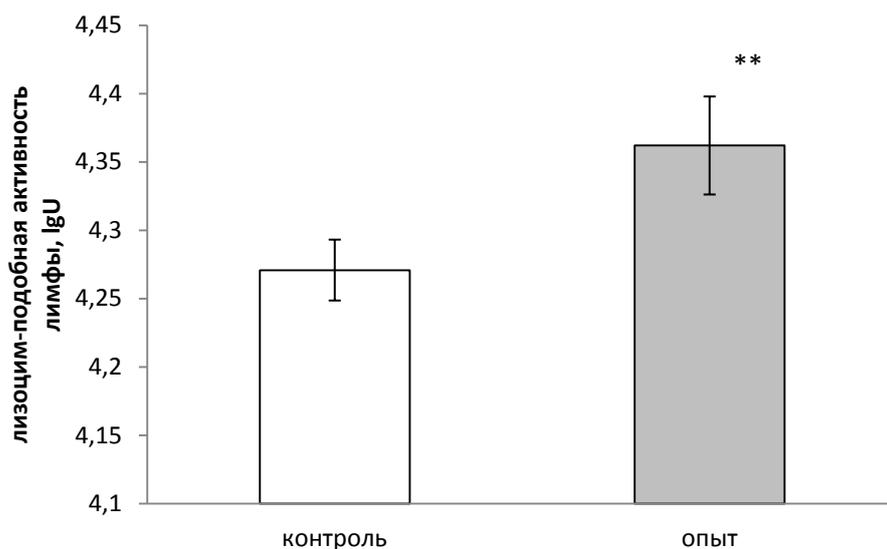


Рис. 19 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на лизоцим-подобную активность лимфы *L. dispar* (**при $P < 0,01$).

Существенное объедание деревьев *B. pendula* в текущем вегетационном сезоне привело к значительному увеличению всех регистрируемых агликонов флавоноидов (табл.1). Концентрация трех из регистрируемых гликозидов флавоноидов была ниже в опытном варианте по сравнению с контролем. Аналогичный эффект был получен и при изучении замедленной индуцированной резистентности, однако в случае с быстрым ответом он более выражен. Более того, мы нашли отрицательную корреляцию между суммарными концентрациями гликозидов и агликонов флавоноидов, изменяющихся под действием дефолиации ($r = -0,74$; $P = 0,013$), что указывает на перераспределение ресурсов при синтезе фенолов в сторону накопления более токсичных агликонов. При изучении быстрого ответа *B. pendula* на искусственную дефолиацию Keinänen с соавторами (1999) было также показано увеличение концентрации агликонов флавоноидов в поврежденных растениях по сравнению с контрольными.

В поврежденных деревьях была зарегистрирована более высокая концентрация 1-(-4-гидроксифенил)-3-оксопропил- β -D-глюкопиранозы по

сравнению с неповрежденными растениями. Ранее Keinanen с соавторами (1999) уже указывали на увеличение концентрации этого соединения в листьях деревьев *B. pendula*, но при искусственной их дефолиации. Morigi с соавторами (1992) продемонстрировали антифидантный эффект 1-(4-гидроксифенил)-3-оксопропил- β -D-глюкопиранозы на личинок 4-го возраста и репеллентный эффект на личинок 1-го возраста *L. dispar*. Эти результаты явно указывают на вовлеченность этого соединения в индуцированную энтоморезистентность березы по отношению к непарному шелкопряду. Однако стоит отметить, что для *E. autumnata* была показана положительная корреляция между концентрацией 1-(4-гидроксифенил)-3-оксопропил- β -D-глюкопиранозы в корме и скоростью роста личинок. Поэтому, не смотря на неспецифичность индукции данного соединения (индуцируется повреждениями разных видов фитофагов), его защитная роль будет определяться видом насекомого, питающимся на растении. Вероятно, это отражает степень адаптации насекомых к кормовому растению.

При сравнении концентрации мирицетина в поврежденных и контрольных деревьях, при изучении механизмов быстрого ответа растений, достоверных отличий получено не было, что указывает на причастность этого соединения только к механизмам замедленного ответа деревьев.

Табл.1 Содержание фенольных соединений в листьях контрольных деревьев *B. pendula* и деревьев *B. pendula*, подвергшихся сильному повреждению личинками *L. dispar* в текущем вегетационном сезоне

№	соединение (вариант)	концентрация в листьях (до высадки насекомых), мг/г сухих листьев	концентрация в листьях (после дефолиации), мг/г сухих листьев	F	P
простые фенолы					
1	неидентифицированный фенол №1 (Контроль)	0,71 ± 0,056	1,10 ± 0,145		
	неидентифицированный фенол №1 (Опыт)	0,69 ± 0,089	1,57 ± 0,101	9,90	0,004
2	1-(-4-гидроксифенил)-3-оксопропил-β-D-глюкопираноза (Контроль)	7,59 ± 0,905	6,86 ± 0,940		
	1-(-4-гидроксифенил)-3-оксопропил-β-D-глюкопираноза (Опыт)	7,71 ± 0,446	11,59 ± 0,781	19,81	<0,001
3 + 4	неидентифицированный фенол №2 + хлорогеновая кислота (Контроль)	1,26 ± 0,075	0,75 ± 0,057		
	неидентифицированный фенол №2 + хлорогеновая кислота (Опыт)	1,52 ± 0,096	0,90 ± 0,054	0,10	0,752
5	производная кумароил-хинной кислоты №1 (Контроль)	1,25 ± 0,084	0,65 ± 0,041		
	производная кумароил-хинной кислоты №1 (Опыт)	1,41 ± 0,086	0,92 ± 0,069	4,90	0,035
6	производная кумароил-хинной кислоты №2 (Контроль)	0,56 ± 0,075	0,36 ± 0,045		
	производная кумароил-хинной кислоты №2 (Опыт)	0,56 ± 0,027	0,45 ± 0,036	2,55	0,122
водорастворимые гликозиды флавоноидов					
7 + 8	гликозиды мирицетина	2,94 ± 0,362	2,66 ± 0,381		

	(Контроль)				
	гликозиды мирицетина (Опыт)	2,32 ± 0,283	2,52 ± 0,277	2,10	0,158
9	гликозид кверцетина №1 (Контроль)	0,84 ± 0,251	0,99 ± 0,259		
	гликозид кверцетина №1 (Опыт)	0,52 ± 0,080	0,95 ± 0,138	6,88	0,014
10	гликозид кверцетина №2 (Контроль)	5,41 ± 0,561	4,46 ± 0,504		
	гликозид кверцетина №2 (Опыт)	5,22 ± 0,358	3,08 ± 0,161	17,24	<0,001
11	гликозид кверцетина №3 (Контроль)	2,71 ± 0,460	2,29 ± 0,338		
	гликозид кверцетина №3 (Опыт)	2,53 ± 0,137	1,55 ± 0,091	10,79	0,003
12	гликозид кверцетина №4 (Контроль)	1,75 ± 0,431	1,36 ± 0,281		
	гликозид кверцетина №4 (Опыт)	1,38 ± 0,068	0,72 ± 0,036	11,83	0,002
13 + 14	гликозиды флавоноида (Контроль)	1,96 ± 0,362	1,82 ± 0,265		
	гликозиды флавоноида (Опыт)	1,85 ± 0,152	1,50 ± 0,146	2,40	0,133
липофильные агликоны флавоноидов					
15	агликон флавоноида (Контроль)	0,42 ± 0,078	0,51 ± 0,167		
	агликон флавоноида (Опыт)	0,40 ± 0,051	1,02 ± 0,093	31,52	<0,001
16 + 17 + 18	акацетин + тетрагидрокси- флавоидиметилэфир +пентагидроксифлавоид (Контроль)	1,96 ± 0,152	2,09 ± 0,351		
	акацетин + тетрагидрокси- флавоидиметилэфир + пентагидроксифлавоид (Опыт)	2,05 ± 0,158	4,67 ± 0,405	40,16	<0,001

Также в результате проведенных исследований было показано изменение концентраций летучих веществ в березе под действием существенного повреждения личинками непарного шелкопряда в тот же год, что и было нанесено повреждение (табл.2). В частности, концентрация линалоола в листьях поврежденных растений была выше по сравнению с концентрацией этого монотерпена в контрольных растениях. Тот же эффект был получен и в работе Vuorinen с соавторами (2007), где авторы тестировали ответ *B. pendula* на дефолиацию *E. autumnata*. В то же время, известно, что линалоол может быть одним из составляющих химических сигналов для привлечения самок паразитоида *Cotesia marginiventris* (Turlings, 1991; Chen, Fadamiro, 2007). Также в нашем эксперименте при повреждении в листьях *B. pendula* увеличилось содержание гераниола и эвгенола. Ранее было показано, что гераниол способен подавлять питание непарного шелкопряда при его добавлении в искусственную питательную среду (Doskotch et al., 1980). На сегодняшний день отсутствует информация о защитной функции эвгенола, хотя известно, что его содержание может увеличиваться в ответ на действие производного жасмоновой кислоты – фитогормона, участвующего в формировании энтоморезистентности у растений (Li et al., 2007).

Табл. 2 Содержание летучих соединений в листьях контрольных деревьев *B. pendula* и деревьев *B. pendula*, подвергшихся сильному повреждению личинками *L. dispar* в текущем вегетационном сезоне.

№	соединение	концентрация в листьях (до высадки насекомых), мг/г сырых листьев	концентрация в листьях (после дефолиации), мг/г сырых листьев	F	P
1	гераниол (Контроль)	1,84 ± 0,41	1,42 ± 0,38		
	гераниол (Опыт)	1,39 ± 0,26	2,70 ± 0,68	5,22	0,031
2	линалоол (Контроль)	0,28 ± 0,05	0,15 ± 0,03		

	линалоол (Опыт)	$0,68 \pm 0,21$	$1,54 \pm 0,41$	6,25	0,029
3	эвгенол (Контроль)	$1,60 \pm 0,30$	$1,42 \pm 0,17$		
	эвгенол (Опыт)	$0,68 \pm 0,17$	$3,13 \pm 0,83$	9,80	0,004
4	гексадеканол (Контроль)	$1,13 \pm 0,19$	$1,92 \pm 0,19$		
	гексадеканол (Опыт)	$1,31 \pm 0,21$	$1,17 \pm 0,21$	5,41	0,028
5 + 6	эвдсмадиенол + гермакратриенол (Контроль)	$2,61 \pm 0,48$	$1,21 \pm 0,22$		
	эвдсмадиенол + гермакратриенол (Опыт)	$2,60 \pm 0,62$	$2,02 \pm 0,36$	1,87	0,183

Глава 5. ВЛИЯНИЕ **БЫСТРОЙ** ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНТОМОРЕЗИСТЕНТНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ **СИЛЬНЫМ** ПОВРЕЖДЕНИЕМ КОРМОВОГО РАСТЕНИЯ, НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЕГО К БАКТЕРИЯМ *B. THURINGIENSIS*

При питании на листьях, поврежденных в этом же году растений, у личинок непарного шелкопряда увеличивается смертность ($F=7,02$; $P=0,015$) (рис. 20) и время развития ($F=15,893$; $P=0,003$) (рис. 21), снижается масса куколок ($F=19,935$; $P=0,003$) (рис. 22). Эти эффекты могут быть связаны с антифидантными и токсическими свойствами агликонов флавоноидов, а также с токсическим действием монотерпенов, изменение концентрации которых было показано при повреждении березы (глава 4).

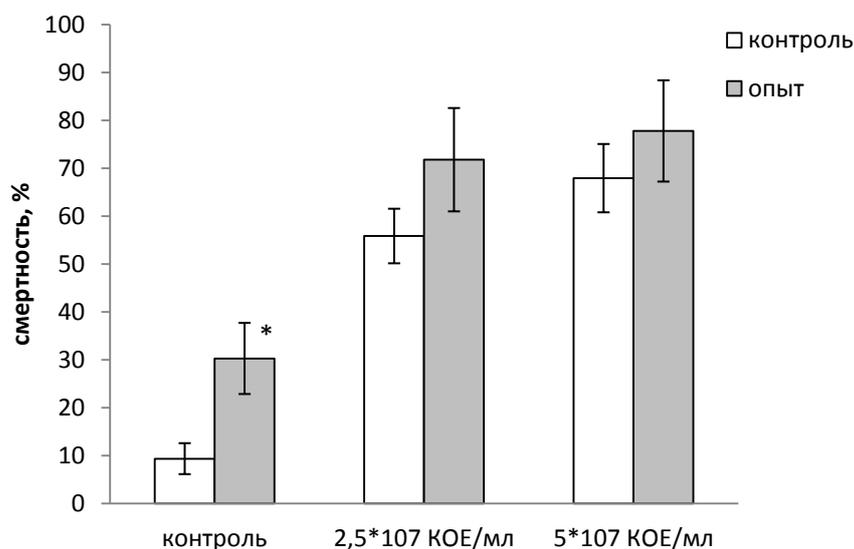


Рис. 20 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на общую выживаемость *L. dispar* и чувствительность к *B. thuringiensis* (*при $P<0,05$).

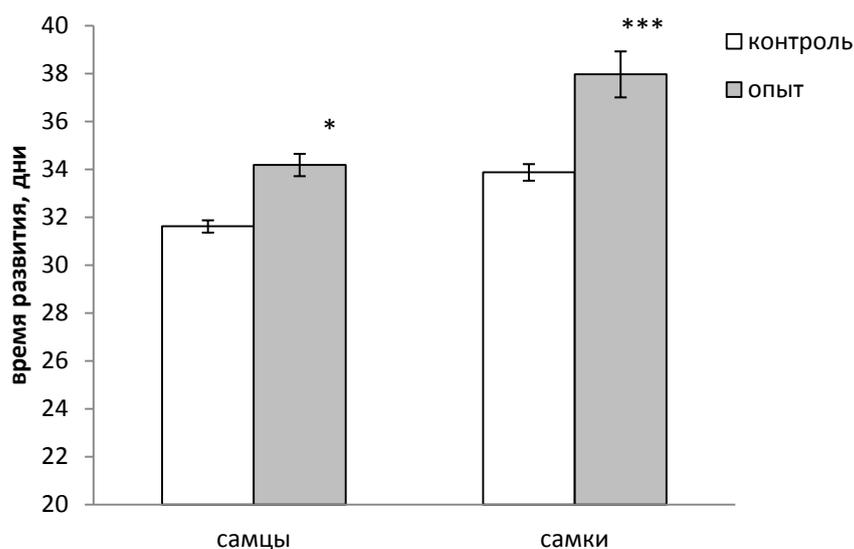


Рис. 21 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на время развития личиночной стадии *L. dispar* (*при $P < 0,05$, *** при $P < 0,001$).

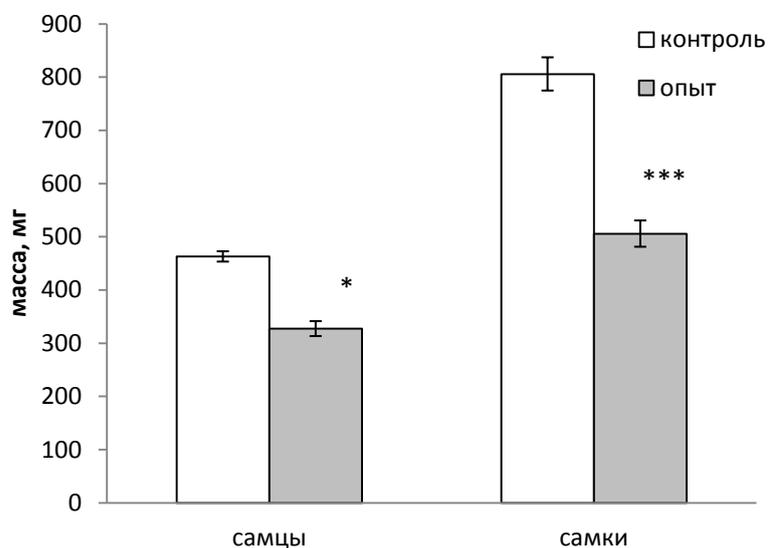


Рис. 22 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на массу куколок *L. dispar* (*при $P < 0,05$, *** при $P < 0,001$).

В результате питания на поврежденных растениях у личинок достоверно увеличивалась активность щелочных протеаз в содержимом среднего кишечника ($F=4,29$; $P=0,04$) (рис. 23). Это может свидетельствовать о компенсаторных механизмах в процессах пищеварения вследствие снижения питательной ценности корма. При снижении массы куколок и увеличении времени развития это может косвенно указывать на антифидантный механизм быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula* по отношению к *L. dispar*. Этот механизм резистентности кормовых растений достаточно широко распространен в природе (Felton, Gatehouse, 1996). Однако для системы «*B. Pendula* – *L. dispar*» это показано впервые. Кроме того, увеличение процентного содержания щелочных протеаз, ингибируемых ЭДТА, в ткани кишечника личинок при питании листвой поврежденных деревьев ($F=12,67$; $P=0,001$) (рис. 24Б) может свидетельствовать об адаптивных изменениях во внутриклеточном или пристеночном пищеварении к изменению состава белков в дефолиированных деревьях березы. Также такое изменение может быть следствием изменения метаболической активности ткани кишечника вследствие увеличения им секреции протеаз. Следует отметить, что другие изучаемые параметры протеолитических ферментов личинок не изменялись под действием энтоморезистентности кормового растения (рис. 24А, 25, 26).

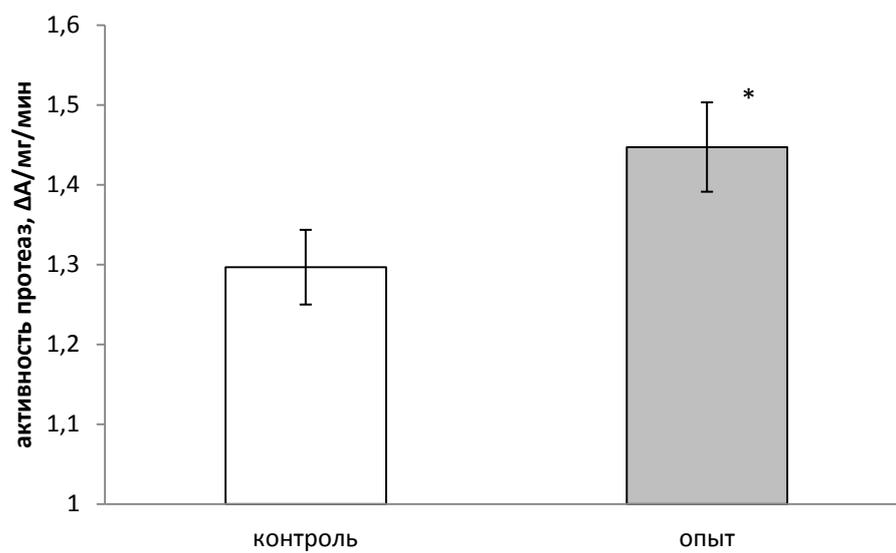


Рис. 23 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на активность щелочных протеаз в содержимом кишечника *L. dispar* (*при $P < 0,05$).

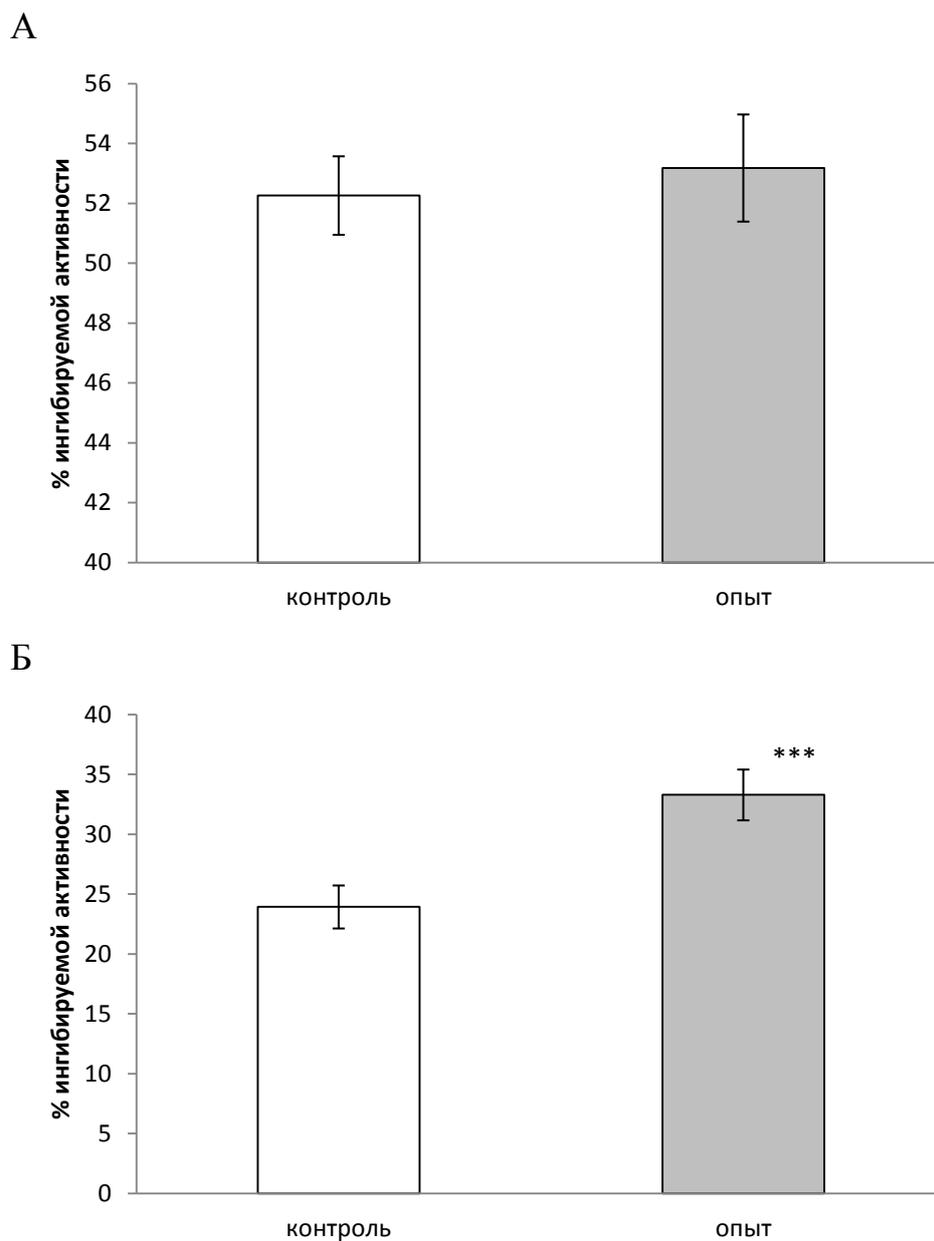


Рис. 24 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на активность различных групп щелочных протеиназ в ткани кишечника *L. dispar*: А – ингибитор PMSF, Б – ингибитор ЭДТА (***) при $P < 0,001$).

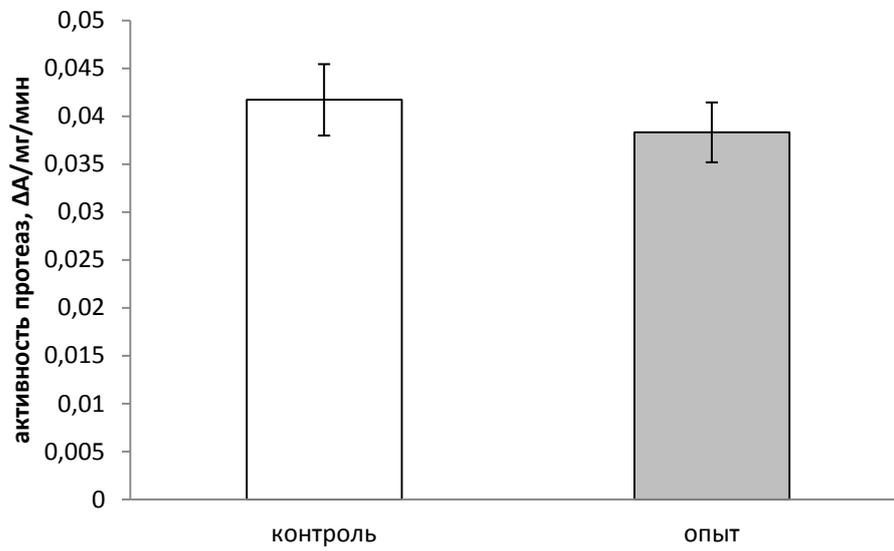


Рис. 25 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на активность щелочных протеаз в ткани кишечника *L. dispar*.

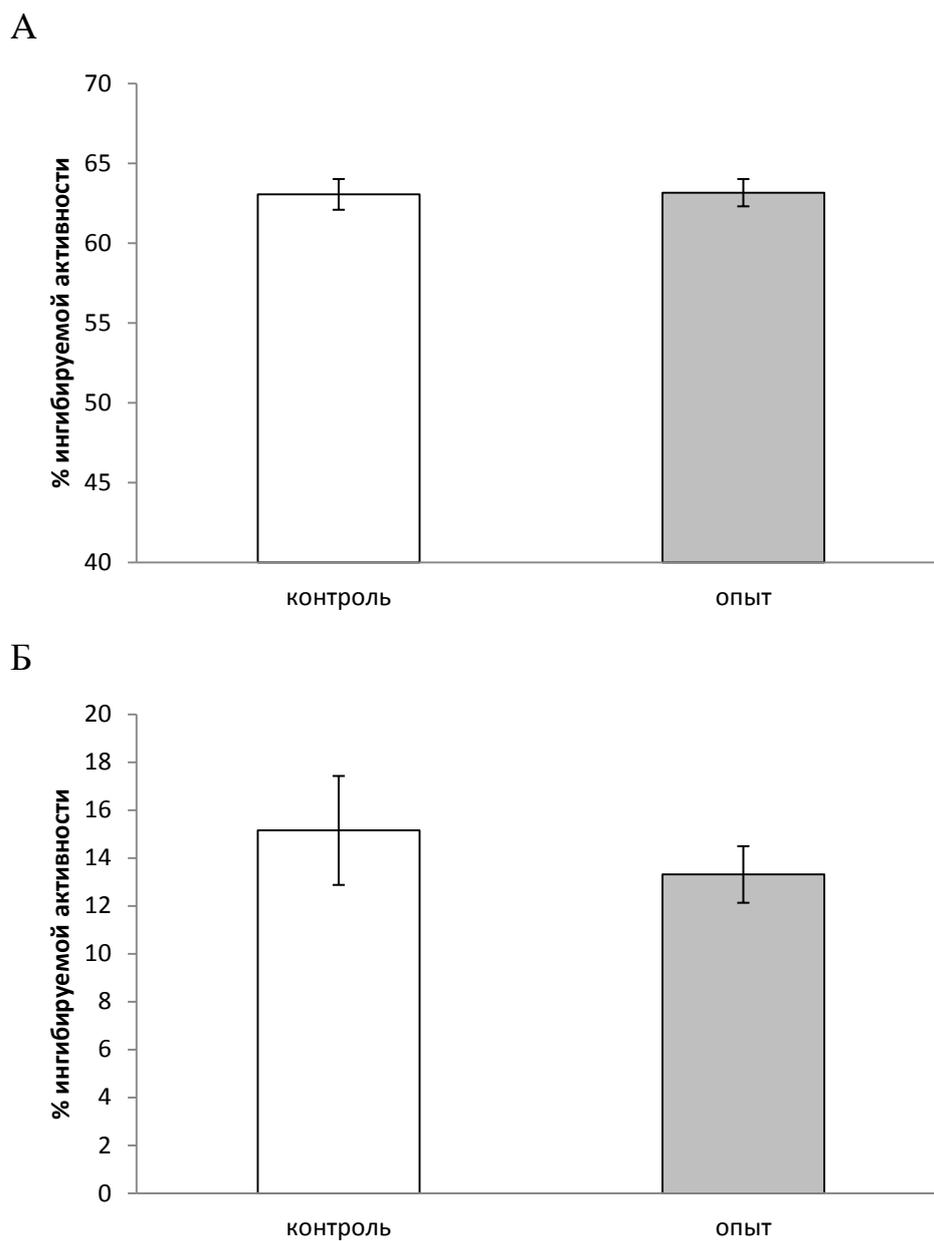


Рис. 26 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на активность различных групп щелочных протеиназ в содержимом кишечника гусениц *L. dispar*: А – ингибитор PMSF, Б – ингибитор ЭДТА.

При оценке влияния энтоморезистентности березы на состояние детоксицирующей системы шелкопряда, было показано снижение активности неспецифических эстераз в лимфе гусениц, питающихся на поврежденных деревьях по сравнению с насекомыми, питающимися на контрольных растениях ($F=4,256$; $P=0,041$) (рис. 27). Стоит отметить, что ранее при моделировании замедленной индуцированной резистентности березы, вызванной искусственными повреждениями, было показано снижение активности неспецифических эстераз в кишечнике личинок, питающихся на поврежденных растениях по сравнению с контрольными (Мартемьянов и др., 2009). Такое снижение активности детоксицирующих ферментов может быть связано с недостаточным питанием и, соответственно, являться следствием перераспределения ресурсов.

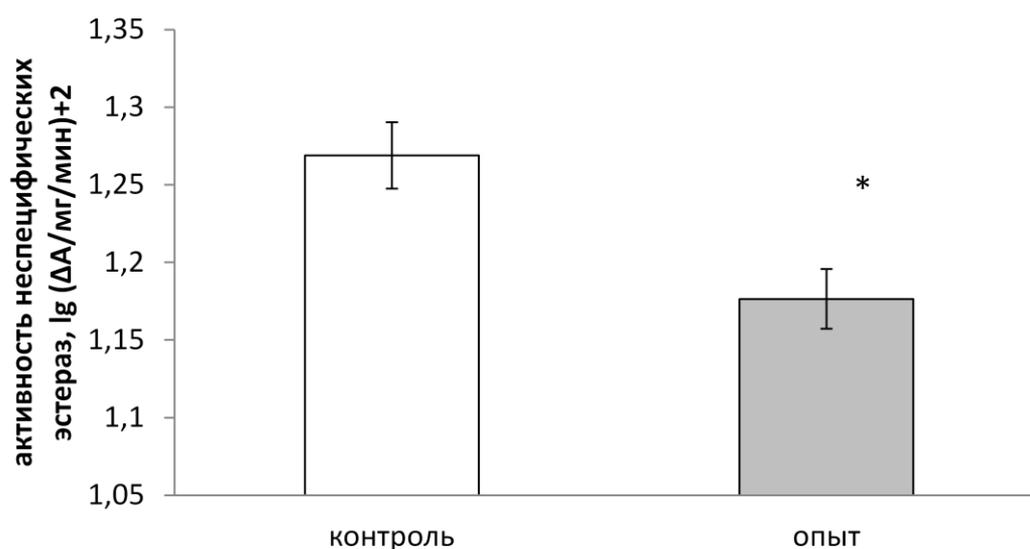


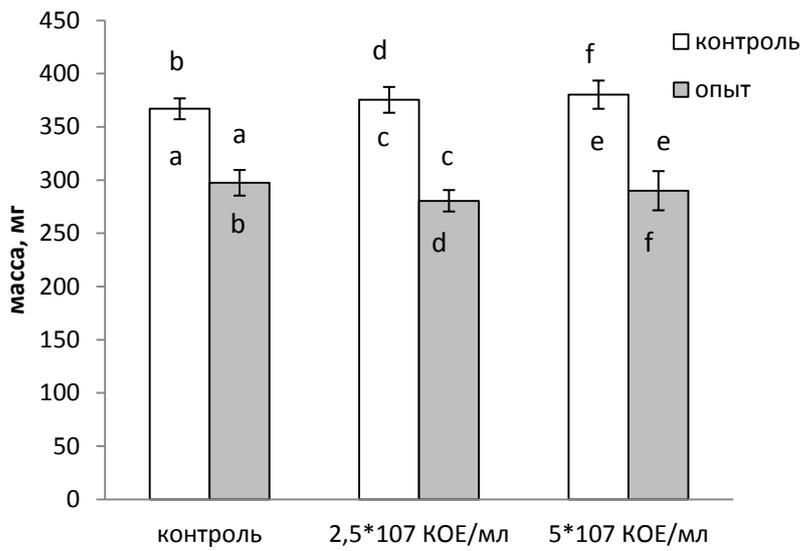
Рис. 27 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на активность неспецифических эстераз в лимфе *L. dispar* (*при $P<0,05$).

При изучении влияния быстрой индуцированной энтоморезистентности кормового растения на чувствительность к бактериям *Bacillus thuringiensis* изменений чувствительности у непарного шелкопряда

зафиксировано не было («дефолиация»*«заражение»): для смертности – $F=0,270$, $P=0,768$; для массы куколок выживших самок – $F=0,206$, $P=0,816$, для массы выживших куколок самцов – $F=0,166$, $P=0,848$; для продолжительности развития личинок самок – $F=3,713$, $P=0,065$; для продолжительности развития личинок самцов – $F=0,486$, $P=0,627$) (рис. 20, 28, 29). Также не было получено достоверных отличий в фагоцитарной активности лимфы ($F=0,343$; $P=0,57$) (рис. 30), лизоцим-подобной активности ткани среднего кишечника ($F=0,047$; $P=0,83$) (рис. 31) и лизоцим-подобной активности лимфы личинок $F=0,165$; $P=0,69$ (рис. 32А), $F=0,026$; $P=0,875$ (рис. 32Б)) непарного шелкопряда между контрольным и опытным вариантами. Достоверное увеличение антибактериальной активности лимфы непарного шелкопряда при питании его на поврежденном в текущем сезоне растении было показано нами в первом эксперименте по изучению влияния **быстрой** индуцированной энтоморезистентности кормового растения (глава 4). Здесь же мы не получили такого эффекта. Это может быть следствием нескольких причин. Во-первых, на проявление индуцированного ответа кормового растения могло оказать влияние наличие/отсутствие дополнительного фактора влияющего на насекомых – климатического. Экспериментальные насекомые в опыте, где отличий в антибактериальной резистентности у гусениц обнаружено не было, содержались в лабораторных условиях. Экспериментальные насекомые в опыте, где были обнаружены отличия в антибактериальной резистентности у гусениц, содержались в полевых условиях. Во-вторых, два этих эксперимента были проведены на экспериментальных деревьях географически отличных участков. Несмотря на приблизительную выравненность участков (возраст деревьев, их экспозиция, положение относительно лесонасаждения) почвенные условия могли отличаться. Исходя из литературных данных, почвенные условия могут влиять на физиологическое состояние фитофагов через их кормовое растение (Keinanen et al., 1999). В-третьих, в разных биотопах березы может отличаться микробиологическое сообщество на поверхности листьев

растений (McCormack, Wildman, Jeffries, 1995; De Costa et al., 2006). Соответственно, изменение антибактериальной резистентности у личинок непарного шелкопряда могло быть следствием действия двух факторов: индуцированного ответа березы и повышенного бактериального фона на листьях опытных растений.

А



Б

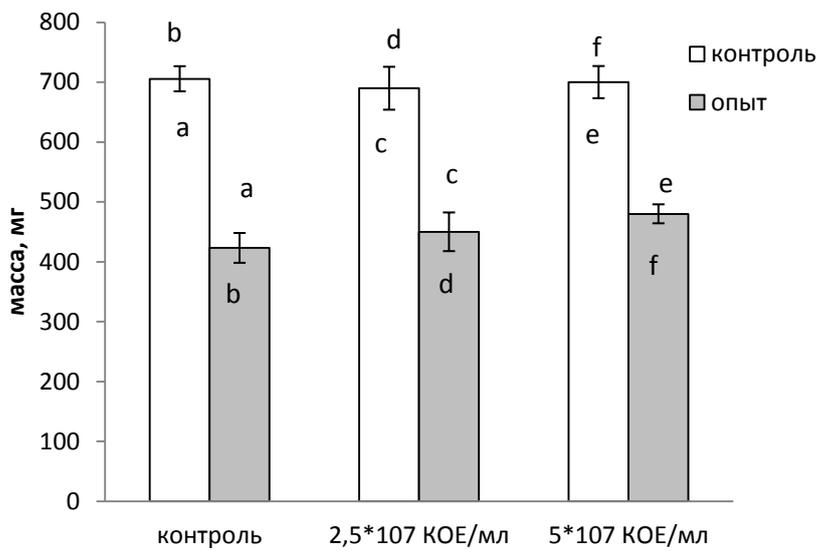
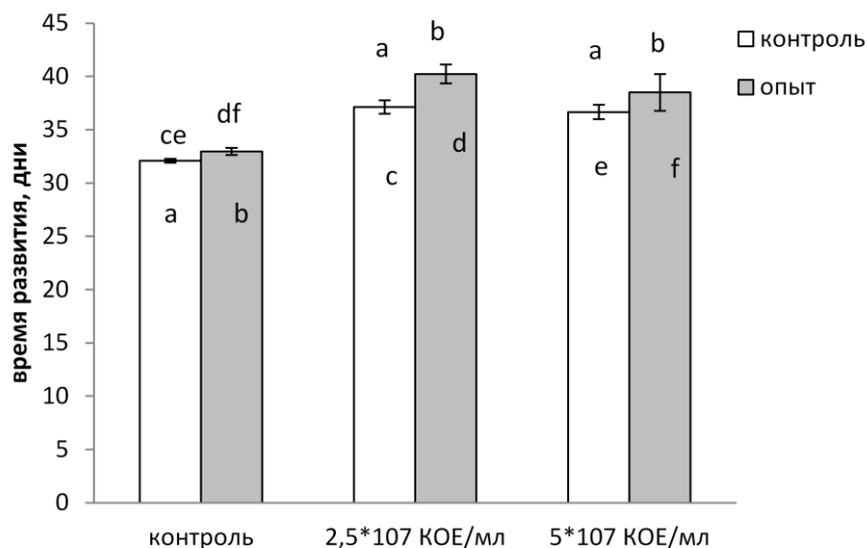


Рис. 28 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на массу куколок *L. dispar*, выживших после инфицирования (А – самцы, Б – самки). Буквы над столбиками указывают наличие достоверных отличий со сравниваемым столбиком при $P < 0,05$.

А



Б

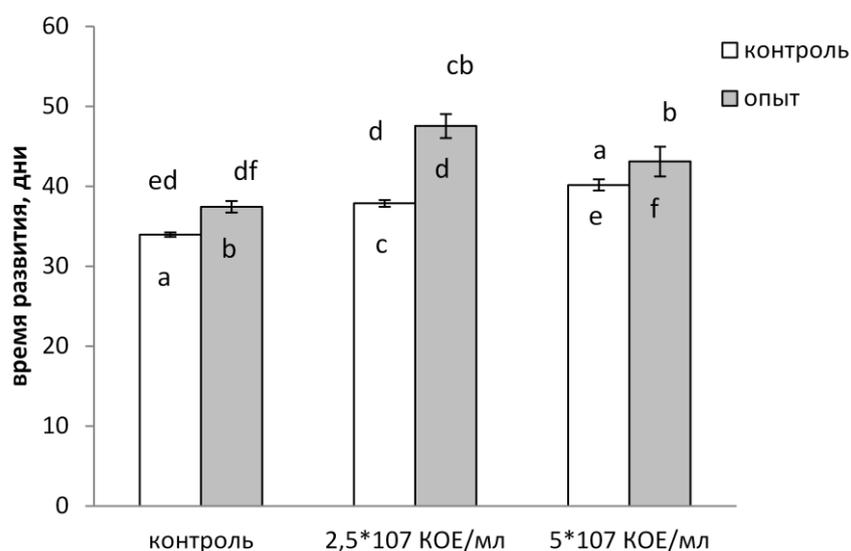


Рис. 29 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на время развития личиночной стадии *L. dispar*, выживших после инфицирования (А – самцы, Б – самки). Буквы над столбиками указывают наличие достоверных отличий со сравниваемым столбиком при $P < 0,05$.

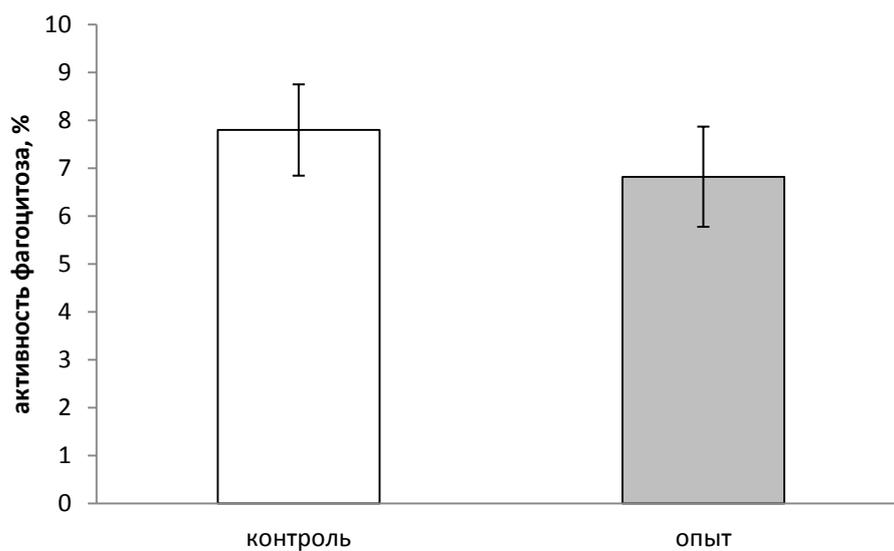


Рис. 30 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на фагоцитарную активность гемолимфы *L. dispar*.

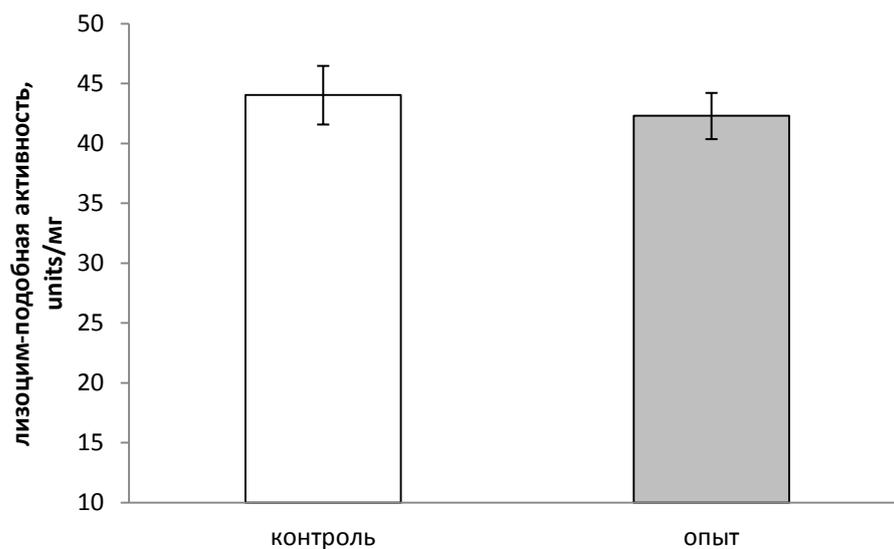
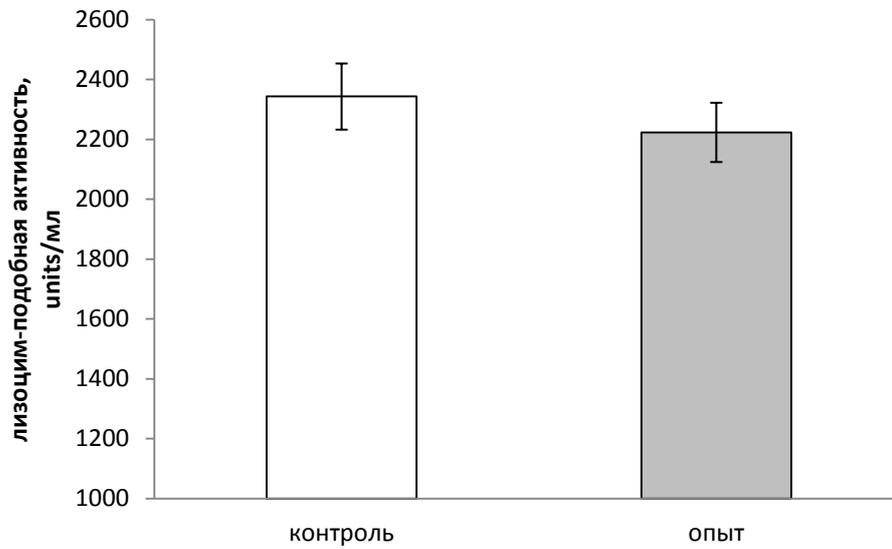


Рис. 31 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на лизоцим-подобную активность ткани среднего кишечника *L. dispar*.

А



Б

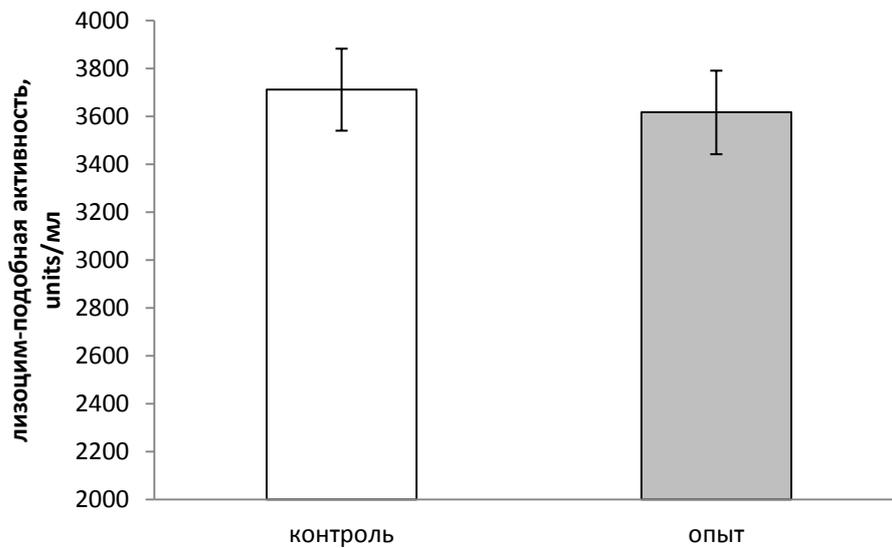


Рис. 32 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной сильным повреждением кормового растения, на лизоцим-подобную активность лимфы гусениц *L. dispar*: А – культура *M. lysodeikticus*, Б – лиофилизированный *M. lysodeikticus*.

Глава 6. ВЛИЯНИЕ ЗАМЕДЛЕННОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ
ЭНТОМОРЕЗИСТЕНТНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ СЛАБЫМ
ПОВРЕЖДЕНИЕМ КОРМОВОГО РАСТЕНИЯ, НА
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА, ПАРАМЕТРЫ
ИММУНИТЕТА И ЗАРАЖЕННОСТЬ ЕГО ПАРАЗИТОИДАМИ

Достоверного влияния замедленной индуцированной энтоморезистентности, вызванной слабым повреждением кормового растения, на жизнеспособность насекомых мы не получили (смертность: $F < 0,001$; $P = 0,987$ (рис. 33); время развития: $F = 0,083$; $P = 0,784$ (рис. 34); масса куколок: $F = 0,283$; $P = 0,614$ (рис. 35)). Это соотносится с исследованием Hunter, Schultz (1993), где был показан дозо-зависимый эффект дефолиации дуба *Quercus rubra* на *L. dispar*.

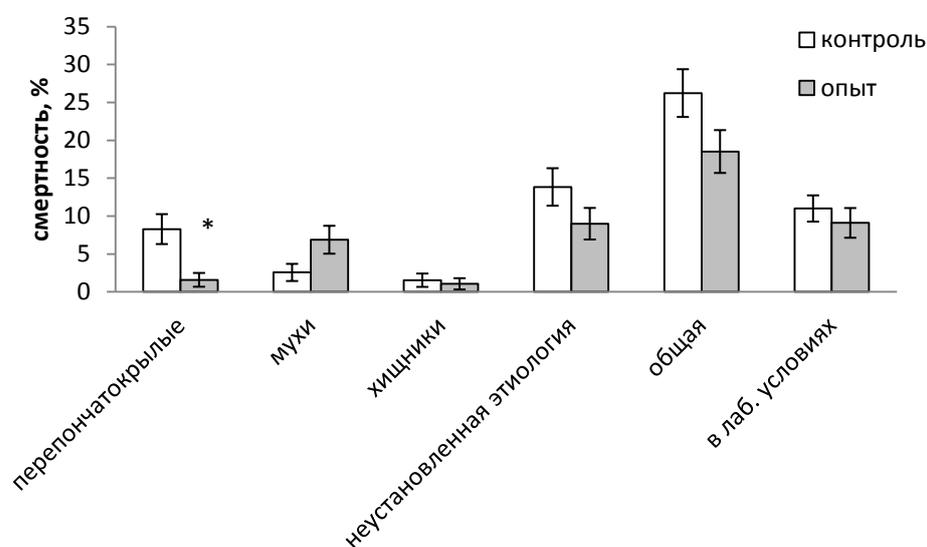


Рис. 33 Влияние замедленной индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной слабым повреждением кормового растения, на смертность *L. dispar* и чувствительность к паразитоидам и беспозвоночным хищникам (* при $P < 0,05$).

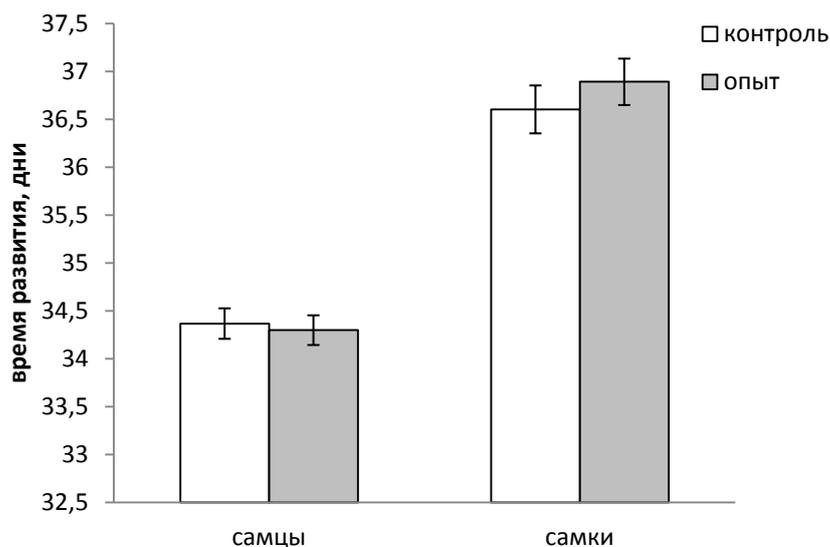


Рис.34 Влияние замедленной индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной слабым повреждением кормового растения, на время развития личиночной стадии *L. dispar*.

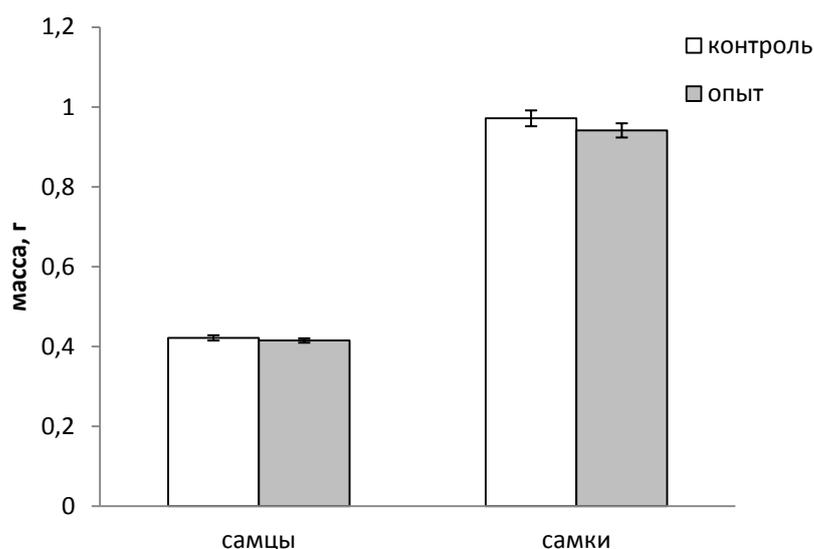


Рис.35 Влияние замедленной индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной слабым повреждением кормового растения, на массу куколок *L. dispar*.

Фенолоксидазная активность лимфы ($F=0,001$; $P=0,97$) (рис. 36), и концентрация гемоцитов в гемолимфе ($F=0,653$; $P=0,421$) (рис. 37) также не отличались между вариантами. Однако в результате питания на поврежденных растениях у самок личинок *L. dispar* достоверно увеличивалась активность инкапсуляции ($F=11,379$; $P=0,019$) (рис. 38).

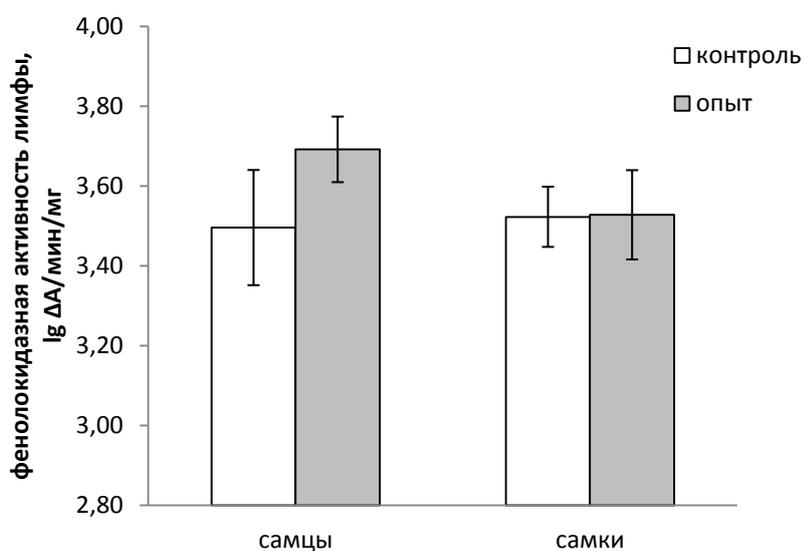


Рис. 36 Влияние замедленной индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной слабым повреждением кормового растения, на фенолоксидазную активность лимфы гусениц *L. dispar*.

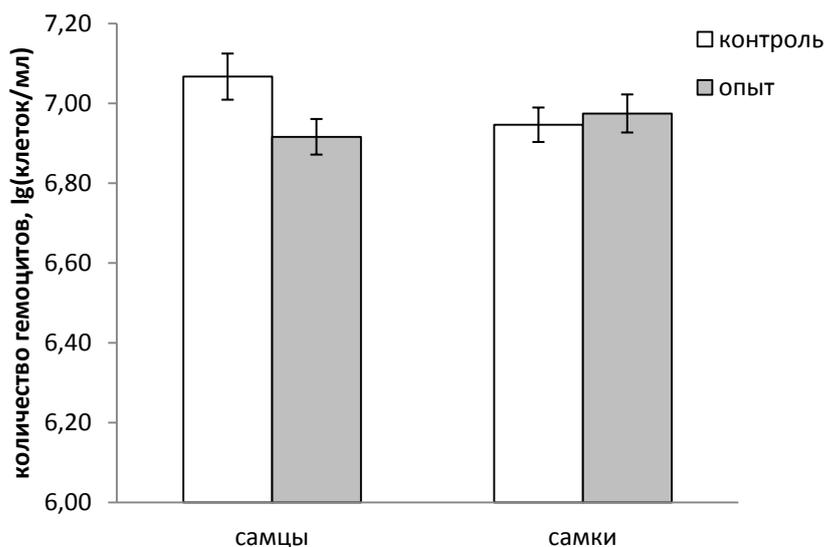


Рис. 37 Влияние замедленной индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной слабым повреждением кормового растения, на концентрацию гемоцитов в гемолимфе гусениц *L. dispar*.

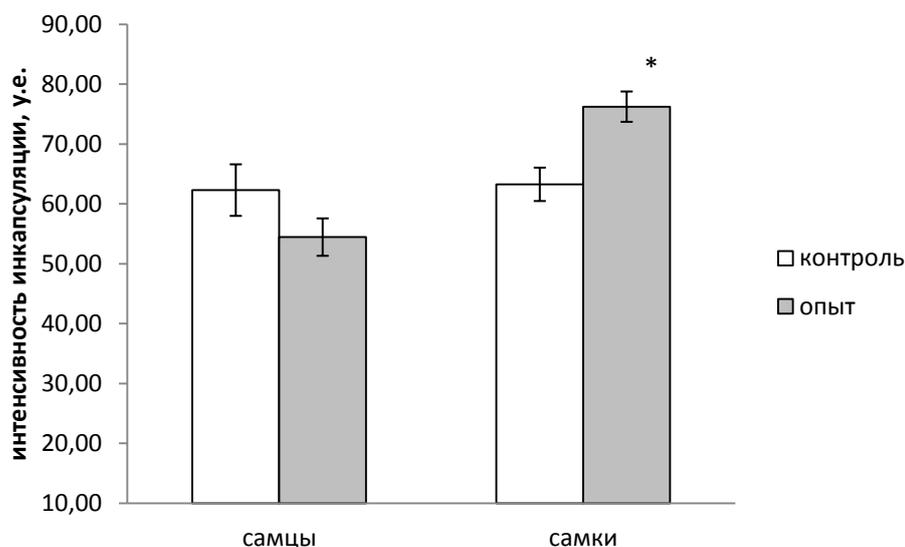


Рис. 38 Влияние замедленной индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной слабым повреждением кормового растения, на активность инкапсуляции нейлонового имплантата в лимфе гусениц *L. dispar* (* при $P < 0,05$).

При оценке уровня паразитизма непарного шелкопряда были выявлены следующие виды паразитоидов: *Meteorus pulchricornis* Wesmael (Hymenoptera, Brachonidae), *Agria affinis* Fall. (Diptera, Sarcophagidae), *Parasetigena silvestris* R.-D. (Diptera, Tachinidae), и хищников: *Calosoma sycophanta* L., *Calosoma denticolle* Gebler (Coleoptera, Carabidae), неидентифицированные виды Raphidioptera. Данные по смертности были разделены на смертность от перепончатокрылых, мух, хищников и смертность от невыясненных причин. Достоверные отличия между вариантами были получены только для смертности от перепончатокрылых ($F=7,0245$; $P=0,038$) (рис. 33). Изменение активности инкапсуляции и снижение чувствительности к паразитированию *Meteorus pulchricornis* личинок, питающихся на поврежденных растениях по сравнению с контрольными, несомненно, говорят о существенной роли индуцированного ответа кормового растения в паразит – хозяинных отношениях на низком уровне популяционной плотности хозяина. При низких уровнях повреждений в эксперименте Караги с соавторами (2006), поставленном на *Betula pubescens* и *E. autumnata*, активность инкапсуляции в куколках была также выше у насекомых, питающихся на ранее дефолированных растениях. В этом исследовании авторы использовали кладки насекомых, собранные в фазе пика численности, мы же – на фазе с низкой плотностью. Схожесть результата при этих различиях может указывать на общую закономерность ответной реакции среди дендрофильных чешуекрылых независимо от влияния «материнского эффекта».

Глава 7. ВЛИЯНИЕ **БЫСТРОЙ** ИНДУЦИРОВАННОЙ
ЭНТОМОРЕЗИСТЕНТНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ **СЛАБЫМ**
ПОВРЕЖДЕНИЕМ КОРМОВОГО РАСТЕНИЯ, НА
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА, ПАРАМЕТРЫ
ИММУНИТЕТА И ЗАРАЖЕННОСТЬ ЕГО ПАРАЗИТОИДАМИ

В результате питания на слабо поврежденных растениях у личинок *L. dispar* не изменились время развития ($F=0,619$, $P=0,452$) (рис. 39) и масса куколок ($F=1,608$; $P=0,243$) (рис. 40). Однако прослеживаются явные тенденции на увеличение времени развития и снижение массы куколок самок *L. dispar*, питающихся листьями с поврежденных деревьев. При низких уровнях повреждений в эксперименте Karagi с соавторами (2006), поставленном на *Betula pubescens* и *E. autumnata*, время развития личинок *E. autumnata* увеличивалось при питании их на поврежденных деревьях *B. pubescens*. Активность инкапсуляции имплантата в гемоцеле личинок ($F>0,001$; $P=0,994$) (рис. 41), фенолоксидазная активность лимфы ($F=0,25$; $P=0,63$) (рис. 42), концентрация гемоцитов в гемолимфе личинок ($F=1,793$; $P=0,214$) (рис. 43) также не изменялись под действием быстрого индуцированного ответа березы на слабые повреждения. Быстрый ответ березы не оказывал эффекта на уровень паразитизма/хищничества, и смертность в лабораторных условиях (рис. 44).

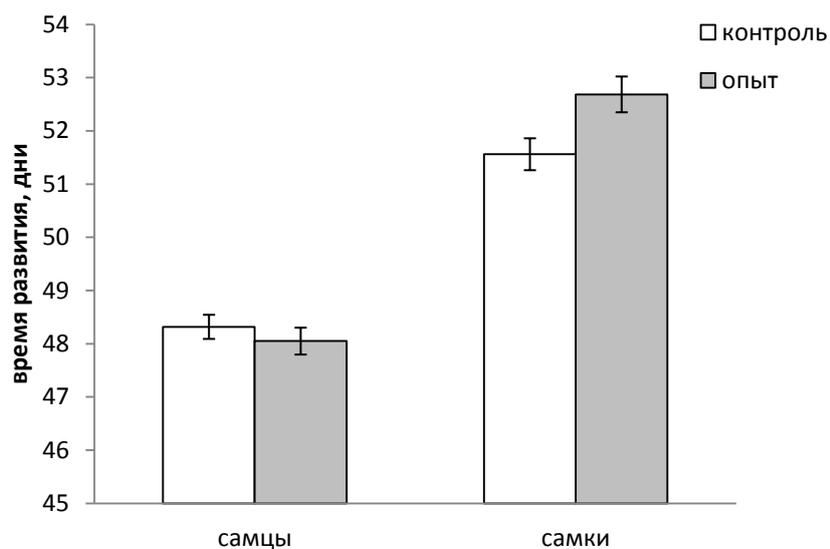


Рис. 39 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной слабым повреждением кормового растения, на время развития личиночной стадии *L. dispar*.

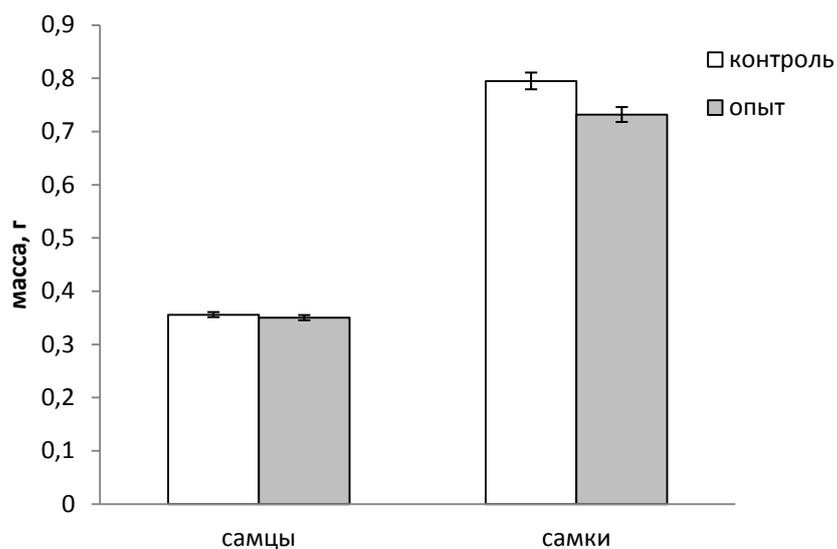


Рис. 40 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной слабым повреждением кормового растения, на массу куколок *L. dispar*.

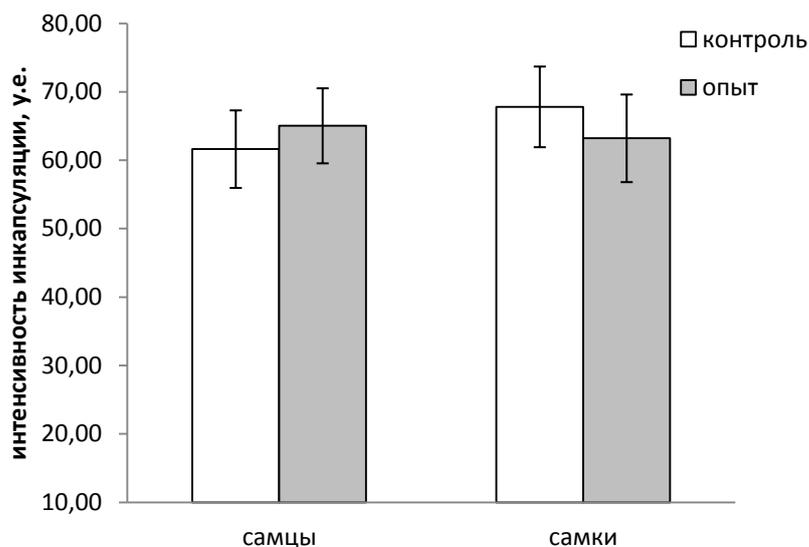


Рис. 41 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной слабым повреждением кормового растения, на активность инкапсуляции нейлонового имплантата в лимфе гусениц *L. dispar*.

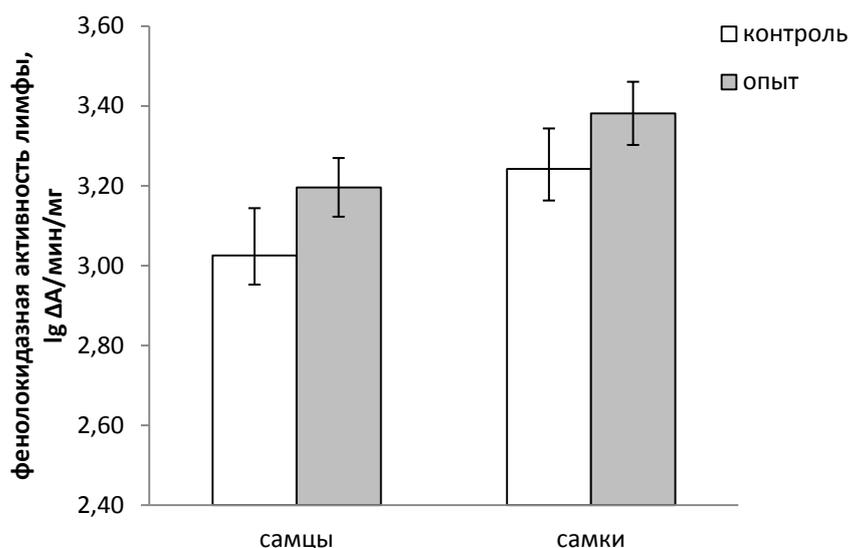


Рис. 42 Влияние замедленной индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной слабым повреждением кормового растения, на фенолоксидазную активность лимфы гусениц *L. dispar*.

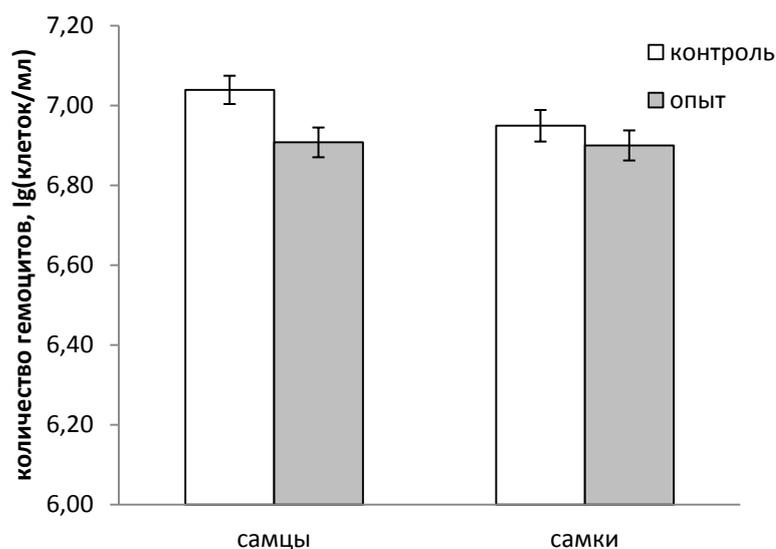


Рис. 43 Влияние замедленной индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной слабым повреждением кормового растения, на концентрацию гемоцитов в гемолимфе гусениц *L. dispar*.

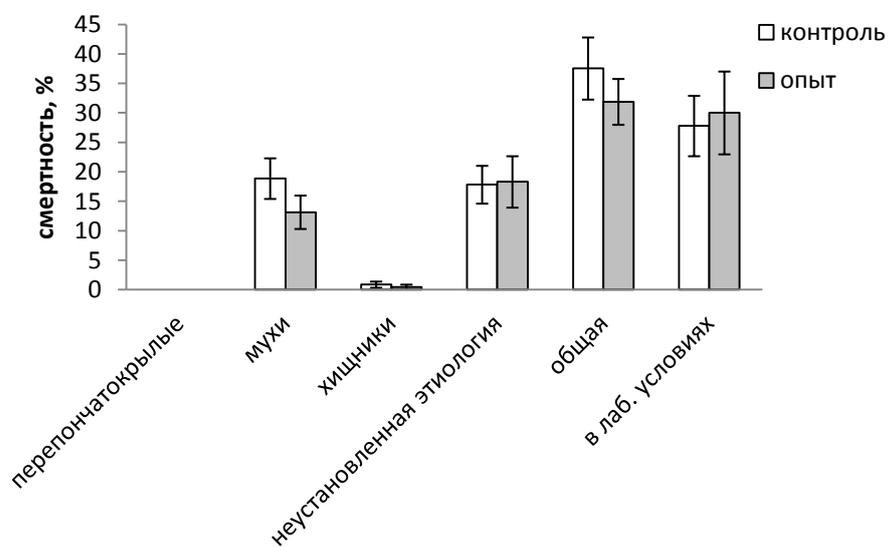


Рис. 44 Влияние быстрой индуцированной энтоморезистентности *B. pendula*, вызванной слабым повреждением кормового растения, на смертность *L. dispar* и чувствительность к паразитоидам и беспозвоночным хищникам.

Следует также отметить, что в эксперименте, где мы моделировали быстрый ответ березы на существенные повреждения, дополнительный контроль (см. главу МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ) дал нам основания полагать, что при уровне повреждения менее 5%, концентрация фенольных и летучих соединений в листьях не изменяется. Следовательно, те тренды негативного воздействия растения на насекомых, которые получены в эксперименте со слабыми повреждениями, вероятно, связаны с другими соединениями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из полученных данных, механизм действия индуцированной энтоморезистентности березы повислой (*B. pendula*), вызванной сильными повреждениями, по отношению к непарному шелкопряду (*L. dispar*) не связан с изменением чувствительности последнего к паразитам. Вероятно, действие березы обусловлено снижением усвояемости питательных веществ и увеличением токсичности корма. Об этом свидетельствует увеличение содержания агликонов флавоноидов в листьях поврежденных растений. Со стороны насекомого антифидантный механизм березы проявляется в увеличении времени развития личиночной стадии насекомых, снижении массы куколок, увеличении активности пищеварительных ферментов и различиях в чувствительности разных полов под действием энтоморезистентности кормовых растений, обусловленных физиологическими особенностями их пищеварения (рис. 45).

Кроме того, результаты исследования свидетельствуют о большем проявлении быстрой индуцированной энтоморезистентности растений, чем замедленной. Однако в исследовании С.А. Бахвалова с соавторами (2006) говорится о большем влиянии замедленного ответа. Данные различия в первую очередь связаны с тем, что в исследовании Бахвалова и соавторов оценивалась двукратная сильная дефолиация, т.е. не в чистом виде замедленный ответ, а совокупность замедленного и быстрого ответов на следующий год после первичных повреждений. В нашем же исследовании повторного сильного повреждения дереву не наносилось. Суммируя эти эксперименты, можно говорить о том, что именно быстрая резистентность *B. pendula*, особенно на фоне ответной реакции растения после повреждения предыдущего года (Бахвалов и

др., 2006) наиболее эффективно воздействует на состояние непарного шелкопряда.

При низком уровне повреждения березы энтоморезистентность растения не формируется. Более того, при питании шелкопряда на поврежденном в предыдущем вегетационном сезоне растении, он получает выгоду в виде усиления антипаразитарных барьеров (рис. 45). Вероятно, химические соединения, образующиеся в растении при слабом повреждении, могут являться своеобразными «информационными молекулами» для филлофагов, что, в свою очередь, может стимулировать модификацию защитных систем насекомого. Так как в биотопе присутствует постоянный прессинг паразитоидов, то подобные сдвиги будут давать преимущество особям с повышенным уровнем защитных реакций. Такое «использование» насекомыми ответа кормового растения может быть способом ускользания популяции шелкопряда из-под постоянного прессинга паразитов в биотопе и приводить к резкому увеличению его численности.

Таким образом, данная работа продемонстрировала многогранность ответа березы по отношению к непарному шелкопряду, изменяющегося в зависимости от степени ее повреждения и от сроков нанесения повреждений (текущий или предыдущий вегетационный сезон). Полученные результаты позволяют приблизиться к объяснению закономерностей колебания популяционной плотности непарного шелкопряда в естественных экосистемах. В работе представлена индуцированная энтоморезистентность кормового растения как совокупность изменяемых параметров березы. Для выявления главных детерминант энтоморезистентности необходимо проведение дальнейших экспериментов с тестированием отдельных химических соединений, вовлеченных в индуцированный ответ растения.



Рис. 45 Схема механизмов регуляции численности *L. dispar*, опосредованных индуцированным ответом кормового растения *B. pendula* на дефолиацию.

ВЫВОДЫ

1) В результате воздействия **быстрой** индуцированной энтоморезистентности, вызванной **сильным** объеданием кормового растения *B. pendula*, снижается выживаемость *L. dispar*, увеличивается продолжительность развития личиночной стадии и снижается масса куколок.

В результате воздействия **замедленной** индуцированной энтоморезистентности вызванной **сильным** объеданием кормового растения, у насекомых увеличивается только продолжительность развития личиночной стадии, выживаемость и масса куколок не меняются.

2) При питании *L. dispar* на растениях, подверженных **слабым** повреждениям в **текущем** и **предыдущем** вегетационных сезонах, показатели жизнеспособности шелкопряда не изменялись.

3) Питание личинок *L. dispar* на растениях, подверженных **сильному** объеданию в **текущем** вегетационном сезоне, приводит к увеличению общей активности щелочных протеаз в содержимом их кишечника и увеличению содержания металлозависимых щелочных протеаз в ткани кишечника.

4) При питании *L. dispar* на растениях, подверженных **сильным** повреждениям в **предыдущем** вегетационном сезоне, показатели иммунитета не изменяются, за исключением увеличения лизоцим-подобной активности лимфы.

5) Чувствительность личинок *L. dispar* к бактериям *B. thuringiensis* не изменяется под влиянием **быстрой** энтоморезистентности, вызванной **сильным** объеданием кормового растения. Чувствительность личинок *L. dispar* к вирусу ядерного полиэдроза не изменяется под влиянием **замедленной** энтоморезистентности, вызванной **сильным** объеданием кормового растения.

6) Питание *L. dispar* на растениях, подверженных **слабым** повреждениям в **предыдущем** вегетационном сезоне, приводит к

увеличению активности инкапсуляции гемолимфы у самок и снижению восприимчивости насекомых к паразитоиду *M. pulchricornis*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бахвалов, С. А. Динамика численности шелкопряда – монашенки (*Lymantria monacha* L., Lym., Lep.) и непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L., Lym., Lep.): роль кормового ресурса и вирусной инфекции / С.А. Бахвалов, А.В. Ильиных, В.Н. Жимерикин, В.В.Мартемьянов // Евразийский энтомологический журнал. – 2002. – V. 26. – 1. – С. 101 – 108.

Бахвалов, С. А. Факторы и экологические механизмы популяционной динамики лесных насекомых-филлофагов / С. А. Бахвалов, Колтунов Е. В., Мартемьянов В. В. – Новосибирск: Издательство СО РАН, 2010. – 299с.

Бахвалов, С.А Реакция непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) на искусственную и естественную дефолиацию березы (*Betula pendula* Roth.) / С.А. Бахвалов, В.Н. Бахвалова, О.В. Морозова, В.В. Мартемьянов // Евразийский энтомологический журнал. – 2006. – 5(4). – С. 347 – 352.

Бахвалов, С.А. Вирозы насекомых / С. А. Бахвалов // В кн.: Глупов В. В. (ред.), Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. – М: Круглый год, 2001. – С. 20 – 75.

Бенкевич, В. И. Массовые появления непарного шелкопряда в европейской части СССР / В. И. Бенкевич. – М.: Наука, 1984 – 143 с.

Вейзер, Я. Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми / Я. Вейзер. – М.: Колос, 1972. – 640 с.

Вилкова, Н.А. Иммуниет растений к вредителям и его связь с пищевой специализацией насекомых-фитофагов / Н. А. Вилкова. – Л.: Наука, 1979. – С.68 – 103.

Вилкова, Н.А. Иммунологическая защита растений от вредителей / Н. А. Вилкова, И. Д. Шапиро // Научные основы защиты растений. – 1984. – С. 116 – 138.

Воробьева, Н.Н. Энтомопатогенные вирусы / Н. Н. Воробьева. – Новосибирск: Наука, 1976. – 287 с.

Глулов, В.В. Механизмы резистентности насекомых / В. В. Глулов // В кн.: Глулов В. В. (ред.), Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. – М.: Круглый год, 2001. – С. 475 – 561.

Запрометов, М. Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях / М. Н. Запрометов. – М.: Наука, 1993. – 272 с.

Ильинский, А. И. Надзор, учет и прогноз массовых размножений хвое- и листогрызущих насекомых в лесах СССР / А. И. Ильинский, И. В. Тропин. – М.: Лесная промышленность, 1965. – 525 с.

Исаев, А. С. Динамика численности лесных насекомых / А. С. Исаев, Р. Г. Хлебопрос, Л. В. Недорезов, Ю. П. Кондаков, В. В. Киселёв. – Новосибирск: Наука, 1984 – 224 с.

Коломиец, Н.Г. Болезни и вредные насекомые лесных насаждений Новосибирского научного центра / Н.Г. Коломиец, Д.А. Богданова // Сибирский Биологический Журнал. – 1992. – 4. – С. 53 – 55.

Колтунов, Е.В. Экология непарного шелкопряда в условиях антропогенного воздействия / Е. В. Колтунов, В. И. Пономарев, С. И. Федоренко. – Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 1998. – 217с.

Колтунов, Е.В. Экология непарного шелкопряда в лесах Евразии / Е. В. Колтунов. – Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2006. – 260 с.

Мартемьянов, В. В. Реакция гусениц непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L., инфицированных вирусом ядерного полиэдроза, на индуцированную резистентность березы *Betula pendula* Roth. / В.В. Мартемьянов, С. А. Бахвалов, М.Дж. Рантала, И.М. Дубовский, Э.Э. Шульц, И.А. Белоусова, А.Г. Стрельников, В.В. Глулов // Экология. – 2009. – 6. – С. 459 – 464.

Рославцева, С.А. Современные воззрения на биохимические механизмы резистентности / С.А. Рославцева // Агрехимия. – 1994. – 10. – С. 143 – 148.

Серебров, В.В. Влияние энтомопатогенных грибов на активность детоксицирующих ферментов гусениц пчелиной огневки *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) и роль детоксицирующих ферментов при формировании резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам / В.В. Серебров, О.Н. Гербер, А.А. Малярчук, В.В. Мартемьянов, А.А. Алексеев, В.В. Глупов // Известия РАН. Серия биологическая. – 2006. – 6. – С. 712 – 718.

Серебров, В.В. Детоксицирующие ферменты насекомых при микозах / В. В. Серебров. – Автореф. дис. ...канд. биол. наук. – Новосибирск. – 2000. – 19 с.

Тарасевич, Л. М. Вирусы насекомых / Л. М. Тарасевич. – М.: Наука, 1975. – 198 с.

Ткачев, А. В. Исследование летучих веществ растений / А. В.Ткачев. – Новосибирск: Офсет, 2008. – 969 с.

Шапиро, И. Д. Иммуитет растений к вредителям и болезням / И. Д. Шапиро, Н. А. Вилкова, Э. И. Слепян. – Л.: Агропромиздат, 1986. – 192 с.

Шкаликов, В.А. Иммуитет растений / В. А. Шкаликов, Ю. Т. Дьяков, И. И. Смирнов, Ф. С.-У. Джалилов, М. Тройков, Ю. Б. Коновалов, В. В. Гриценко. – М.: Колос, 2005. – 190 с.

Эдельман, Н. М. Влияние биохимического состава корма на возрастные изменения физиологического состояния насекомых / Н. М. Эдельман // Вопросы экологии. – М.: Высшая школа, 1962 – Т. 7. – С. 211 – 213.

Яхонтов В. В. Экология насекомых / В. В. Яхонтов. – М.: Высшая школа, 1969. – 488с.

Abraham, E. G. Mosquito midgut barriers to malaria parasite development / E. G. Abraham, M. Jacobs-Lorena // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2004. – V. 34. – P. 667 – 671.

Ali, M.I. Influence of host plant on occluded virus productivity and lethal infectivity of a baculovirus / M.I. Ali, S.Y. Young, G.W. Felton, R.W. McNew // Journal of Invertebrate Pathology. – 2002. – 81. – P. 158 – 165.

Ali, M.I. Influence of interspecific and intraspecific host plant variation on the susceptibility of heliothines to a baculovirus / M.I. Ali, G.W. Felton, T. Meade, S.Y. Young // *Biological Control*. – 1998. – 12. – P. 42 – 49.

Amirhusin, B. Soyacystatin N inhibits proteolysis of wheat alpha-amylase inhibitor and potentiates toxicity against cowpea weevil / B. Amirhusin, R.E. Shade, H. Koiwa, P.M. Hasegawa, R.A. Bressan, L.L. Murdock, K. Zhu-Salzman // *Journal of Economic Entomology*. – 2004. – 97. – P. 2095 – 2100.

An, C. Proteolytic activation and function of the cytokine Spätzle in innate immune response of a lepidopteran insect, *Manduca sexta* / C. An, H. Jiang, M.R. Kanost // *FEBS Journal*. – 2010. – 277. – P. 148 – 162.

Anderson, K. Structure and properties of protein P4, the major bacteria-inducible protein in pupae of *H. cecropia* / K. Anderson, H. Steiner // *Insect Biochemistry*. – 1987. – V. 17. – P. 133 – 140.

Baldwin, I.T. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores / I.T. Baldwin, C.A. Preston // *Planta*. – 1999. – 208. – P. 137 – 145.

Baldwin, I.T. Volatile signaling in plant–plant interactions: “talking trees” in the genomics era / I.T. Baldwin, R. Halitschke, A. Paschold, C.C. von Dahl, C.A. Preston // *Science*. – 2006. – 311. – P. 812 – 815.

Bao, Y. Induction of hemolin gene expression by bacterial cell wall components in eri-silkworm, *Samia cynthia ricini* / Y. Bao, Y. Yamano, I. Morishima // *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2007. – 146. – P. 147 – 151.

Barbehenn, R.V. Hydrolyzable tannins as “quantitative defenses”: limited impact against *Lymantria dispar* caterpillars on hybrid poplar / R.V. Barbehenn, A. Jaros, G. Lee, C. Mozola, Q. Weir, J-P. Salminen // *Journal of Insect Physiology*. – 2009. – 55. – P. 297 – 304.

Barbehenn, R.V. Tannins in plant-herbivore interactions / R.V. Barbehenn, C.P. Constabel // *Phytochemistry*. – 2011. – 72. – P. 1151 – 1565.

Barbehenn, R.V. Tree resistance to *Lymantria dispar* caterpillars: importance and limitations of foliar tannin composition / R.V. Barbehenn, A.

Jaros, G. Lee, C. Mozola, Q. Weir, J-P. Salminen // *Oecologia*. – 2009. – 159. – P. 777 – 788.

Bettencourt, R. Cell adhesion properties of hemolin, an insect immune protein in the Ig superfamily / R. Bettencourt, H. Lanz-Mendoza, K.R. Lindquist, I. Faye // *European Journal of Biochemistry*. – 1997. – 250. – P. 630 – 637.

Bogenschutt, H. Gypsy moth outbreak and control in southwest Germany / H. Bogenschutt, K. Maier, C. Trzebitzy // *Lymantriidae*. – 1990. – P. 89.

Bolter, C.J. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate / C.J. Bolter, M.A. Jongsma // *Journal of Insect Physiology*. – 1995. – V. 41. – P. 1071 – 1078.

Boman, H.G. Cell-free immunity in *Cecropia* A model system for antibacterial proteins / H.G. Boman, I. Faye, G.H. Gudmundsson, J. Lee, D. Lidholm // *European Journal of Biochemistry*. – 1991. – V. 201. – P. 23 – 31.

Bonello, P. Systemic effects of *Heterobasidion annosum* (Basidiomycotina) infection on the phenolic metabolism of ponderosa pine and the feeding behavior of *Ips paraconfusus* (Coleoptera:Scolytidae) / P. Bonello, A. J. Storer, W. R. McNee, T.R. Gordon, D. L. Wood, W. Heller // *Journal of Chemical Ecology*. – 2003. – V. 29. – P. 1167 – 1182.

Bones, A.M. The myrosinase-glucosinolate system, its organization and biochemistry / A.M. Bones, J.T. Rossiter // *Physiologia Plantarum*. – 97. – P. 194 – 208.

Bouarab, K. A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences / K. Bouarab, R. Melton, J. Peart, D. Baulcombe, A. Osbourn // *Nature*. – 2002. – 418(6900). – P. 889 – 892.

Bown, A.W. Insect footsteps on leaves stimulate the accumulation of 4-aminobutyrate and can be visualized through increased chlorophyll fluorescence and superoxide production / A.W. Bown, D.E. Hall, K.B. MacGregor // *Plant Physiology*. – 2002. – 129. – P. 1430 – 1434.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding / M. M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – V. 72. – P. 248 – 254.

Broderick, N.A. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity / N.A. Broderick, K.F. Raffa, J. Handelsman // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – 103(41). – P. 15196 – 9.

Brown, J.H. Complex species interactions and the dynamics of ecological systems: long-term experiments / J.H. Brown, T.G. Whitham, S.K. Morgan Ernest, C.A. Gehring // *Science*. – 2001. – 293(5530). – P. 643 – 650.

Brown, K.K. Biological targets of isothiocyanates / K.K. Brown, M.B. Hampton // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2011. – 1810. – P. 888 – 894.

Bukovinszky, E. Consequences of constitutive and induced variation in plant nutritional quality for immune defence of a herbivore against parasitism / T. Bukovinszky, E.H. Poelman, R. Gols, G. Prekatsakis, L.E. Vet, J.A. Harvey, M. Dicke // *Oecologia*. – 2009. – 160. – P. 299 – 308.

Byun-McKay, A. Wound-induced terpene synthase gene expression in Sitka spruce that exhibit resistance or susceptibility to attack by the white pine weevil / A. Byun-McKay, K.A. Godard, M. Toudefallah, D.M. Martin, R. Alfaro, J. King, J. Bohlmann, A.L. Plant // *Plant Physiology*. – 2006. – 140(3). – P. 1009 – 1021.

Cabrera-Brandt, M.A. Differences in the detoxification metabolism between two clonal lineages of the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera:Aphididae) reared on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) / M.A. Cabrera-Brandt, E. Fuentes-Contreras, C.C. Figueroa // *Chilean Journal of Agricultural Research*. – 2010. – V. 70. – 4. – P. 567 – 575.

Cao, H. Effect of the glycosylation of flavonoids on interaction with protein / H. Cao, D.H. Wu, H.X. Wang, M. Xu // *Spectrochim Acta A*. – 2009. – 73. – P. 972 – 975.

Capinera, J. Influence of natural diets and larval density on gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Argyiidae) egg mass characteristics / J. Capinera // Canadian Entomologist. – 1977. – 109. – P. 1313 – 1318.

Cerenius, L. Coagulation in Invertebrates / L. Cerenius, K. Soderhall // Journal of Innate Immunity. – 2011. – 3. – P. 3 – 8.

Cerenius, L. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates / L. Cerenius, K. Soderhall // Immunological Reviews. – 2004. – V. 198. – P. 116 – 126.

Cerenius, L. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity / L. Cerenius, B.L. Lee, K. Söderhäll // Trends in Immunology. – 2008. – 29. – P. 263 – 271.

Chen, L. Differential electroantennogram response of females and males of two parasitoid species to host-related green leaf volatiles and inducible compounds / L. Chen, H.Y. Fadamiro // Bulletin of Entomological Research. – 2007. – 97. – P. 515 – 522.

Cheng, T.C. Identification and analysis of Toll-related genes in the domesticated silkworm, *Bombyx mori* / T.C. Cheng, Y.L. Zhang, C. Liu, P.Z. Xu, Z.H. Gao, Q.Y. Xia, Z.H. Xiang // Developmental and Comparative Immunology. – 2008. – 32. – P. 464 – 475.

Cipollini, D. Costs and benefits of induced resistance to herbivores and pathogens in plants / D. Cipollini, M. Heil // CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources. – 2010. – 5. – No. 005

Clark, K.D. Isolation and identification of a plasmatocyte-spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudaletia includes* / K.D. Clark, L.L. Pech, M.R. Stand // The Journal of Biological Chemistry. – 1997. – 272. – P. 23440 – 7.

Clem, R.J. Baculoviruses and apoptosis: a diversity of genes and responses / R.J. Clem // Current Drug Targets. – 2007. – 8. – P. 1069 – 74.

Cornell, H.V. Herbivore responses to plant secondary compounds: a test of phytochemical coevolution theory / H.V. Cornell, B.A. Hawkins // *The American naturalist*. – 2003. – V. 161. – 4. – P. 507 – 522.

Daffre, S. Lipopolysaccharide interaction with hemolin, an insect member of the Ig-superfamily / S. Daffre, I. Faye // *FEBS Letters*. – 1997. – 408. – P. 127 – 130.

Daloze, D. A toxic dipeptide from the defense glands of the Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, Say) / D. Daloze, J.C. Braekman, J.M. Pasteels // *Science*. – 1986. – 233. – P. 221 – 223.

De Costa, D.M. Variation of phyllosphere microflora of different rice varieties in sri lanka and its relationship to leaf anatomical and physiological characters / D.M. De Costa, R.M.P.S. Rathnayake, W.A.J.M. De Costa, W.M.D. Kumari, D.M.N. Dissanayake // *Journal of Agronomy and Crop Science*. – 2006. – 192. – P. 209 – 220.

Dean, P. Hyperphagocytic haemocytes in *Manduca sexta* / P. Dean, U. Potter, E.H. Richards, J.P. Edwards, A.K. Charnley, S.E. Reynolds // *Journal of Insect Physiology*. – 2004. – 50. – P. 1027 – 1036.

Dicke, M. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help' / M. Dicke, I.T. Baldwin // *Trends in Plant Science*. – 2010. – 15. – P. 167 – 175.

Doskotch, R.W. Nerolidol: an antifeeding sesquiterpene alcohol for gypsy moth larvae from *Melaleuca leucadendron* / R.W. Doskotch, H. Cheng, T.M. Odell, L. Girard // *Journal of Chemical Ecology*. – 1980. – 6. – P. 845 – 851.

Dubovskiy, I.M. Phagocytic activity and encapsulation rate of *Galleria mellonella* larvae hemocytes during bacterial infection by *Bacillus thuringiensis* / Dubovskiy I.M., Krukova N.A., Glupov V.V. 2008 // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2008. – V. 98. – P. 360 – 362.

Duetting, P.S. Plant waxy bloom on peas affects infection of pea aphids by *Pandora neoaphidus* / P.S. Duetting, H. Ding, J. Neufeld, S.D. Eigenbrode // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2003. – 84. – P. 149 – 158.

Duffey, S.S. The impact of host-plant on the efficacy of baculoviruses / S. S. Duffey, K. Hoover, B. Bonning, B. D. Hammock // In: Roe, M., Kuhr, R. (eds.), *Reviews in Pesticide Toxicology*. – NC: Toxicology Communications Raleigh. – 1995. – V. 3. – P. 137-275.

Dunn, P.E. Regulation of antibacterial protein synthesis following infection and during metamorphosis of *Manduca sexta* / P.E. Dunn, T.J. Bohnert, V. Russell // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1994. – 712. – P. 117-130.

Durrant, W.E. Systemic acquired resistance / W.E. Durrant, X. Dong // *Annual Review of Phytopathology*. – 2004. – 42. – P. 185 – 209.

Ehrlich, P.R. Butterflies and plants: a study in coevolution / P.R. Ehrlich, P.H. Raven // *Evolution* (Lawrence, Kans). – 1964. – 18. – P. 586 – 608.

Elder, B.D. Induced plant defenses, host-pathogen interactions, and forest insect outbreaks / B.D. Elder, B.J. Rehill, K.J. Haynes, G. Dwyer // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – 110(37). – P. 14978 – 83.

Eleftherianos, I. Developmental modulation of immunity: changes within the feeding period of the fifth larval stage in the defence reactions of *Manduca sexta* to infection by *Photorhabdus* / I. Eleftherianos, H. Baldwin, R.H. French-Constant, S.E. Reynolds // *Journal of Insect Physiology*. – 2008. – 54(1). – P. 309 – 318.

Eum, J.H. Analysis of the immune-inducible genes of *Plutella xylostella* using expressed sequence tags and cDNA microarray / J.H. Eum, Y.R. Seo, S.M. Yoe, S.W. Kang, S.S. Han // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2007. – 31. – P. 1107 – 1120.

Fabrick, J.A. cDNA cloning, purification, properties and function of beta-1,3-glucan recognition protein from a pyralid moth, *Plodia interpunctella* / J.A. Fabrick, J.E. Bacer, M.R. Kanost // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2003. – 33. – P. 579 – 594.

Farrar, R.J. Host plant effects on the activity of selected nuclear polyhedrosis viruses against the corn earworm and beet armyworm (Lepidoptera:

Noctuidae) / R.J. Farrar, R.L. Ridgway // *Environmental Entomology*. – 2000. – 29. – P. 108 – 115.

Fatouros, N.E. Herbivore-induced plant volatiles mediate in-flight host discrimination by parasitoids / N.E. Fatouros, J.J. van Loon, K.A. Hordijk, H.M. Smid, M. Dicke // *Journal of Chemical Ecology*. – 2005. – 31. – P. 2033 – 2047.

Felton, G.W. Antinutritive plant defence mechanisms / G. W. Felton, J. A. Gatehouse // In: Lehane M. J., Billingsley P. F. (eds.), *Biology of the Insect Midgut*. – London: Chapman and Hall. – 1996. – P. 373 – 416.

Fineblum, W.L. Tradeoff between resistance and tolerance to herbivore damage in a morning glory / W.L.Fineblum, M.D.Rausher // *Nature*. – 1995. – V. 377. – P. 517 – 520.

Forschler, B.T. Diet and the susceptibility of *Helicoverpa zea* (Noctuidae: Lepidoptera) to a nuclear polyhedrosis virus / B.T. Forschler, S.Y. Young, G.W. Felton // *Environmental Entomology*. – 1992. – 21. – P. 1220 – 1223.

Francis, F. Characterisation of aphid myrosinase and degradation studies of glucosinolates / F. Francis, G. Lognay, J.P. Wathelet, E. Haubruge // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. – 2002. – 50. – P. 173 – 182.

Freitak, D. Immune system responses and fitness costs associated with consumption of bacteria in larvae of *Trichoplusia ni* / D. Freitak, C.W. Wheat, D.G. Heckel // *BMC Biology*. – 2007. – 5. – P. 56.

Futuyma, D.J. Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores / D.J. Futuyma, A. Agrawal // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – V. 106. – 43. – P. 18054 – 18061.

Gandhe, A.S. Analysis of bacteria-challenged wild silkworm, *Antheraea mylitta* (Lepidoptera) transcriptome reveals potential immune genes / A.S. Gandhe, K.P. Arunkumar, S.H. John, J. Nagaraju // *BMC Genomics*. – 2006. – 7. – P. 184.

Gatehouse, J.A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction / J.A. Gatehouse // *New Phytologist*. – 2002. – V. 156. – P. 145 – 169.

Gettins, P.G. Serpin structure, mechanism and function / P.G. Gettins // *Chemical Reviews*. – 2002. – 102. – P. 4751 – 4804.

Ghumare, S.S. Performance of *Spodoptera litura Fabricius* on different host plants: influence of nitrogen and total phenolics of plants and mid-gut esterase activity of the insect / S.S. Ghumare, S.N. Mukherjee // *Indian Journal of Experimental Biology*. – 2003. – 41(8). – P. 895 – 899.

Gillespie, J. Fungal elicitors of insect immune responses / J.P. Gillespie, A.M. Bailey, B. Cobb, A. Vilcinskas // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. – 2000. – 44. – P. 49 – 68.

Giri, A.P. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VII. Changes in the plant's proteome / A.P. Giri, H. Wünsche, S. Mitra, J.A. Zavala, A. Muck, A. Svatoš, I.T. Baldwin // *Plant Physiology*. – 2006. – 142. – P. 1621 – 1641.

Grijpma, P. Overview of research on lymantrids in Eastern and Western Europe / P. Grijpma // *Lymantriidae*. – 1990. – P. 21 – 49.

Gupta, A.P. Insect immunocytes and other hemocytes: roles in cellular and humoral immunity / A.P. Gupta // In: Gupta, A.P. (ed.), *Immunology of Insects and other Arthropods*. Boca Raton: CRC Press. – 1991. – P. 19 – 118.

Gupta, A. P. Immunology of Invertebrates: Cellular [электронный ресурс] / A. P. Gupta // *Encyclopedia of Life Science*. – 2001b. – P. 1 – 9. – Режим доступа: <http://els.net>

Gupta, A. P. Immunology of Invertebrates: Humoral [электронный ресурс] / A. P. Gupta // *Encyclopedia of Life Science*. – 2001a. – P. 1 – 6. – Режим доступа: <http://els.net>

Hall, D.E. Footsteps from insect larvae damage leaf surfaces and initiate rapid responses / D.E. Hall, K.B. MacGregor, J. Nijssen, A.W. Bown // *European Journal of Plant Pathology*. – 2004. – 110. – P. 441 – 447.

Haukioja, E. Induced long-term resistance of birch foliage against defoliators: defensive or incidental? / E. Haukioja, S. Neuvonen // *Ecology*. – 1985. – 66. – P. 1303 – 1308.

Haukioja, E. Retarded growth of a geometrid larva after mechanical damage to leaves of its host tree / E. Haukioja, P. Niemela // *Annales Zoologici Fennici*. – 1977. – 14. – P. 48 – 52.

Haukioja, E. Tree defenses against insects / E. Haukioja // In: Bent E., Tuzun S. (eds.), *Multigenic and induced systemic resistance in plants*. - New York: Springer Science+Business Media. – 2006. – P. 279–295.

Haviola, S. Foliar phenolics are differently associated with *Epirrita autumnata* growth and immunocompetence / S. Haviola, L. Kapari, V. Ossipov, M.J. Rantala, T. Ruuhola, E. Haukioja // *Journal of Chemical Ecology*. – 2007. – 33. – P. 1013 – 1023.

Hegedus, D. Midgut proteases from *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: characterization, cDNA cloning, and expressed sequence tag analysis / D. Hegedus, D. Baldwin, M. O’Grady, L. Braun, S. Gleddie, A. Sharpe, D. Lydiate, M. Erlandson // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. – 2003. – 53. – P. 30 – 47.

Hilker, M. How do plants “notice” attack by herbivorous arthropods? / M. Hilker, T. Meiners // *Biological Reviews*. – 2010. – V. 85. – 2. – P. 267 – 280.

Hilker, M. Insect egg deposition induces *Pinus sylvestris* to attract egg parasitoids / M. Hilker, C. Kobs, M. Varama, K. Schrank // *Journal of Experimental Biology*. – 2002. – 205. – P. 455 – 461.

Hill, J.K. Climate change and evolutionary adaptations at species' range margins / J.K. Hill, H.M. Griffiths, C.D. Thomas // *Annual Review of Entomology*. – 2011. – 56. – P. 143 – 159.

Hodgson, D.J. Differential selection of baculovirus genotypes mediated by different species of host food plant / D.J. Hodgson, A.J. Vanbergen, S.E. Hartley, R.S. Hails, J.S. Cory // *Ecology Letters*. – 2002. – 5. – P. 512 – 518.

Hountondji, F.C.C. Herbivore-induced plant volatiles trigger sporulation in entomopathogenic fungi: the case of *Neozygites tanajoe* infecting the Cassava green mite / F.C.C. Hountondji, M.W. Sabelis, R. Hanna, A. Janssen // *Journal of Chemical Ecology*. – 2005. – 31. – P. 1033 – 1021.

Hunter, M.D. Induced plant defenses breached? Phytochemical induction protects an herbivore from disease / M.D. Hunter, J.C. Schultz // *Oecologia*. – 1993. – V. 94. – P. 195 – 203.

Invertebrate Immunity. – New York: Springer Science+Business Media, 2010. – 316 c.

Iwanaga, S. Recent Advances in the Innate Immunity of Invertebrate Animals / S. Iwanaga, B. L. Lee // *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. – 2005. – V. 38. – 2. – P. 128 – 150.

Janmaat, A.F. The cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* varies with the host plant of *Trichoplusia ni* / A.F. Janmaat, J.H. Myers // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2005. – 272. – P. 1031 – 1038.

Jolles, P. What's new in lysozyme research? / P. Jolles, J. Jolles // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 1984. – V. 63. – 2. – P. 165 – 189.

Kaitaniemi, P. Delayed induced changes in the biochemical composition of host plant leaves during an insect outbreak / P. Kaitaniemi, K. Ruohomaki, V. Ossipov, E. Haukioja, K. Pihlaja // *Oecologia*. – 1998. – V. 116. – P. 182 – 190.

Kanost, M.R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity / M.R. Kanost // *Developmental & Comparative Immunology*. – 1999. – 23. – P. 291 – 296.

Kapari, L. Defoliating insect immune defense interacts with induced plant defense during a population outbreak / L. Kapari, E. Haukioja, M.J. Rantala, T. Ruuhola // *Ecology*. – 2006. – V. 87. – P. 291 – 296.

Kato, Y. Lipopolysaccharide-lipophorin complex formation in insect hemolymph: a common pathway of lipopolysaccharide detoxification both in insects and in mammals / Y. Kato, Y. Motoi, K. Taniai, K. Kadono-Okuda, M.

Yamamoto, Y. Higashino, M. Shimabukuro, S. Chowdhury, J. Xu, M. Sugiyama // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 1994. – 24. – P. 547 – 555.

Kausrud, K. Population dynamics in changing environments: the case of an eruptive forest pest species / K. Kausrud, B. Okland, O. Skarpaas, J.C. Grégoire, N. Erbilgin, N.C. Stenseth // *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. – 2012. – 87(1). – P. 34 – 51.

Keating, S.T. Relationship between susceptibility of gypsy moth larvae (Lepidoptera: Lymantriidae) to a baculovirus and host-plant constituents / S.T. Keating, W.G. Yendol, J.C. Schultz // *Environmental Entomology*. – 1988. – 17. – P. 942 – 958.

Keinanen, M. Effect of sample preparation method on birch (*Betula pendula* Roth) leaf phenolics / M. Keinanen, R. Julkunen-Tiitto // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1996. – 44. – P. 2724 – 2727.

Keinanen, M. High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves / M. Keinanen, R. Julkunen-Tiitto // *Journal of Chromatography A*. – 1998. – 793. – P. 370 – 377.

Keinanen, M. Trade-offs in phenolic metabolism of silver birch: Effects of fertilization, defoliation, and genotype / M. Keinanen, R. Julkunen-Tiitto, P. Mutikainen, M. Walls, J. Ovaska, E. Vapaavuori // *Ecology*. – 1999. – 80. – P. 1970 – 1986.

Kessler, A. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis / A. Kessler, I.T. Baldwin // *Annual Review of Plant Biology*. – 2002. – 53. – P. 299 – 328.

Kessler, A. Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuate* / A. Kessler, R. Halitschke, C. Diezel, I.T. Baldwin // *Oecologia*. – 2006. – 148. – P. 280 – 292.

Kim, H.J. Immune activation of apolipoprotein III and its distribution in hemocyte from *Hyphantria cunea* / H.J. Kim, H.J. Je, S.Y. Park, I.H. Lee, B.R. Jin, H.K. Yun, C.Y. Yun, Y.S. Han, Y.J. Kang, S.J. Seo // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2004. – 34. – P. 1011 – 1023.

Kloth, J.K. Association mapping of plant resistance to insects / K.J. Kloth, M.P.M. Thoen, H. J. Bouwmeester, M.A. Jongsma, M. Dicke // *Trends in Plant Science*. – 2012. – 17(5). – P. 311 – 319.

Koizumi, N. Lipopolysaccharide-binding protein of *Bombyx mori* participates in a hemocyte-mediated defense reaction against Gram-negative bacteria / N. Koizumi, Y. Imai, A. Morozumi, M. Imamura, T. Kadotani, K. Yaoi, H. Iwahanaa, R. Sato // *Journal of Insect Physiology*. – 1999. – 45. – P. 853 – 859.

Kouassi, K.C. Variation in the susceptibility of the forest tent Caterpillar (Lepidoptera: Lasiocampidae) to *Bacillus thuringiensis* variety kurstaki HD-1: Effect of the Host Plant / K.C. Kouassi, F. Lorenzetti, C. Guertin, J. Cabana, Y. Mauffette // *Journal of Economic Entomology*. – 2001. – V. 94. – 5. – P. 1135 – 1141.

Kraaijeveld, A.R. The coevolution of host resistance and parasitoid virulence / A.R. Kraaijeveld, J.J. Van Alphen, H.C. Godfray // *Parasitology*. – 1998. – 116. – P. 29 – 45.

Krause, S.C. Defoliation intensity and larval age interact to affect sawfly performance on previously injured *Pinus resinosa* / S.C. Krause, K.F. Raffa // *Oecologia*. – 1995. – 102. – P. 24 – 30.

Kryukova, N.A. The effect of *Habrobracon hebetor* venom on the activity of the prophenoloxidase system and the generation of reactive oxygen species and encapsulation in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae / N.A. Kryukova, I.M. Dubovskiy, E. A. Chertkova, Y.L. Vorontsova, I.A. Slepneva, V.V. Glupov // *Journal of Insect Physiology*. – 2011. – 57. – P. 796 – 800.

Kuc J., Caruso F.L. Activated coordinated chemical defense against diseases in plant / J. Kuc, F.L. Caruso // In: Hedin, P.A. (ed.), *Host Plant Resistance to Pest*. – Washington: American Chemical Society Press. – 1977. – P. 78-89.

Ladendorff, N.E. Bacteria-induced protein P4 (hemolin) from *Manduca sexta*: a member of the immunoglobulin superfamily which can inhibit hemocyte aggregation / N.E. Ladendorff, M.R. Kanost // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. – 1991. – 18. – P. 285 – 300.

Lahtinen, M. HPLC analysis of leaf surface flavonoids for the preliminary classification of birch species / M. Lahtinen, K. Lempa, J-P. Salminen, K. Pihlaja // *Phytochemical Analysis*. – 2006. – 17. - P. 197 – 203.

Laitinen, M-L. Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population / M-L. Laitinen, R. Julkunen-Tiitto, M. Rousi // *Journal of Chemical Ecology*. – 2000. - V. 26. – 7. – P. 1609 – 1622.

Lance, D. R. Host-seeking behavior of the gypsy moth: the influence of polyphagy and highly apparent host plants / D. R. Lance // In: Ahmad S. (ed.), *Herbivorous Insects: Host-seeking Behavior and Mechanisms*. – New York: Academic Press. – 1983. – P. 201–224.

Larson, S. Resistance in trees to insects – an overview of mechanisms and interactions / S. Larson // In: Wagner, M. R., Clancy, K. M., Lieutier, F., Paine, T.D. (Eds.), *Mechanisms and Development of Resistance in Trees to Insects*. – Netherlands: Kluwer Academic Publisher. – 2002. – P. 1-29.

Lavine, M.D. Haemocytes from *Pseudoplusia includens* express multiple alpha and beta integrin subunits / M.D. Lavine, M.R. Strand // *Insect Molecular Biology*. – 2003. – 12. – P. 441 – 452.

Lavine, M.D. Immune challenge differentially affects transcript abundance of three antimicrobial peptides in hemocytes from the moth *Pseudoplusia includes* / M.D. Lavine, G. Chen, M.R. Strand // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2005. – 35. – P. 1335 – 1346.

Lazarevic, J. Adaptation of the gypsy moth to an unsuitable host plant / J. Lazarevic, V. Peric-Mataruga, B. Stojkovic, N. Tucic // *Entomologia Experimentalis et Applicata*. – 2002. – V. 102. – P. 75 – 86.

Lee, K. P. Flexible diet choice offsets protein costs of pathogen resistance in a caterpillar / K.P. Lee, J.S. Cory, K. Wilson, D. Raubenheimer, S.J. Simpson // *Proceedings of the Royal Society B*. – 2006. – V. 273. – P. 823 – 829.

Lee, K.Y. Molecular characterization of the insect immune protein hemolin and its high induction during embryonic diapause in the gypsy moth, *Lymantria*

dispar / K.Y. Lee, F.M. Horodyski, A.P. Valaitis, D.L. Denlinger // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2002. – 32. – P. 1457 – 1467.

Lee, Y.S. Purification, cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella* / Y.S. Lee, E.K. Yun, W.S. Jang, I. Kim, J. Lee, S.Y. Park, K.S. Ryu, S.J. Seo, C.H. Kim, I.H. Lee // *Insect Molecular Biology*. – 2004. – 13. – P. 65 – 72.

Leon, L.J. Apolipoprotein III: lipopolysaccharide binding requires helix bundle opening / L.J. Leon, H. Idangodage, C.P. Wan, P.M. Weers // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2006 – 348. – P. 1328 – 1333.

Leonard, D.E. Bioecology of the Gypsy Moth / D. E. Leonard // In: Doane, Ch. C., McManus, M. L. (eds.), *The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Management*. – Washington: U.S. Department of Agriculture. – 1981. – P. 65–216.

Li, W. Cloning, expression and phylogenetic analysis of hemolin, from the Chinese oak silk moth, *Antheraea pernyi* / W. Li, O. Terenius, M. Hirai, A.S. Nilsson, I. Faye // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2005. – 29. – P. 853 – 864.

Li, Z. Chemical changes and overexpressed genes in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) upon methyl jasmonate treatment / Z. Li, X. Wang, F. Chen, H.J. Kim // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2007. – 55(3). – P. 706 – 713.

Lindroth, R.L. Quaking aspen: effects on gypsy moth susceptibility to nuclear polyhedrosis virus / R.L. Lindroth, S-Y. Hwang, T.L. Osier // *Journal of Chemical Ecology*. – 1999. – V. 25. – P. 1331 – 1341.

Lorenzo, O. Ethylene response factor integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense / O. Lorenzo, R. Piqueras, J.J. Sanchez-Serrano, R. Solano // *Plant Cell*. – 2003. – 15. – P. 165 – 178.

Loxdale, H.D. The evolutionary improbability of ‘generalism’ in nature, with special reference to insects / H.D. Loxdale, G. Lushai, J.A. Harvey // *Biological Journal of the Linnean Society*. – 2011. – 103. – P. 1 – 18.

Ma , G. Mechanisms of inducible resistance against *Bacillus thuringiensis* endotoxins in invertebrates / G. Ma, M. Sarjan, C. Preston, S.A. Asgari, O. Schmidt // *Insect Science*. – 2005. – V.12. – P. 319 – 330.

Ma, C. A β -1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade / C. Ma, M.R. Kanost // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – 275. – P. 7505 – 7514.

MacGibbon, D.B. An electrophoretic separation of cabbage aphid and plant glucosinolases / D.B. MacGibbon, R.M. Allison // *New Zealand Journal of Science*. – 1971. – 14. – P. 134 – 140.

Martemyanov, V.V Rapid induced resistance of silver birch affects both innate immunity and performance of gypsy moths: the role of plant chemical defenses / V.V. Martemyanov, I.M Dubovskiy, I.A. Belousova, S.V. Pavlushin, D.V. Domrachev, M.J. Rantala, J-P. Salminen, S.A. Bakhvalov, V.V. Glupov // *Arthropod-Plant Interactions*. – 2012. – 6. – P. 507 – 518.

Martemyanov, V.V. Sex-specific variations in gypsy moth fitness, immune function, a parasite resistance mediated by background defoliation of the host plant / V.V. Martemyanov, I.M. Dubovskiy, I.A. Belousova, N.S. Shokorova, S.V. Pavlushin, V.V. Glupov // *Ecological Parasitology and Immunology*. – 2013. – 2. – P. 7.

Martemyanov, V.V. The effects of delay induced response of silver birch on gypsy moth's performance, immune responses and resistance against baculovirus / V.V. Martemyanov, I.M. Dubovskiy, M.J. Rantala, J-P. Salminen, I.A. Belousova, S.V. Pavlushin, S.A. Bakhvalov, V.V. Glupov // *Journal of chemical ecology*. – 2012. – 38(3). – P. 295 – 305.

McCormack, P. The influence of moisture on the suppression of *Pseudomonas syringae* by *Aureobasidium pullulans* on an artificial leaf surface / P. McCormack, H.G. Wildman, P. Jeffries // *FEMS Microbiology Ecology*. – 1995. – 16. – P. 159 – 166.

McNaughton, S.J. Grass leaf silicification: natural selection for an inducible defense against herbivores / S.J. McNaughton, J.L. Tarrants // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1983. – 80. – P. 790 – 791.

McNaughton, S.J. Silica as a defense against herbivory and a growth promotor in African grasses / S.J. McNaughton, J.L. Tarrants, M.M. McNaughton, R.H. Davis // Ecology. – 1985. – 66. – P. 528 – 535.

Meselhy, K.M. Novel antisickling, antioxidant and cytotoxic prenylated flavonoids from the bark of *Morus alba* L. / K.M. Meselhy, L.N. Hammad, N. Farag // Life Science Journal. – 2012. – 9. – P. 830 – 841.

Miller, W.E. Extrinsic effects on fecundity-maternal weight relations in capital-breeding Lepidoptera / W.E. Miller // The Journal of the Lepidopterists' Society. – 2005. – 59. – P. 143 – 160.

Mirabella, R. The *Arabidopsis* her1 mutant implicates GABA in E-2-hexenal responsiveness / R. Mirabella, H. Rauwerda, E.A. Struys, C. Jakobs, C. Triantophylides, M.A. Haring, R.C. Schuurink // The Plant Journal. – 2008. – 53. – P. 197 – 213.

Mithöfer, A. Plant defense against herbivores: chemical aspects / A. Mithöfer, W. Boland // Annual Review of Plant Biology. – 2012. – V. 63. – P. 431 – 450.

Mori, K. Synthesis of 3,4'-dihydroxypropiophenone 3- β -D-glucopyranoside, a constituent of *Betula platyphylla* var. *japonica*, by enzymatic transglucosylation / K. Mori, Z-H. Qian, S. Watanabe // European Journal of Organic Chemistry. – 1992. – P. 485 – 487.

Musser, R.O. Evidence that the caterpillar salivary enzyme glucose oxidase provides herbivore offense in solanaceous plants / R.O. Musser, D.F. Cipollini, S.M. Hum-Musser, S.A. Williams, J.K. Brown, G.W. Felton // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. – 2005. – 58. – P. 128 – 137.

Mutikainen, P. Herbivore resistance in *Betula pendula*: Effect of fertilization, defoliation, and plant genotype / P. Mutikainen, M. Walls, J. Ovaska,

M. Keinanen, R. Julkunen-Tiitto, E. Vapaavuori // *Ecology*. – 2000. – 81. – P. 49 – 65.

Nappi, A.J. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity / A.J. Nappi, B.M. Christensen // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2005. – 35. – P. 443 – 459.

Ochiai, M. Purification of a β -1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* / M. Ochiai, M. Ashida // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – 263. – P. 12056 – 62.

Ojala, K. Diet affects the immune defence and life-history traits of an Arctiid moth *Parasemia plantaginis* / K. Ojala, R. Julkunen-Tiitto, L. Lindström, J. Mappes // *Evolutionary Ecology Research*. – 2005. – V. 7. – P. 1153 – 1170.

Onoe, H. Peptidoglycan recognition protein (PGRP) from eri-silkworm, *Samia Cynthia ricini*; protein purification and induction of the gene expression / H. Onoe, A. Matsumoto, K. Hashimoto, Y. Yamano, I. Morishima // *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*. – 2007. – 147. – P. 512 – 519.

Osier, T. L. Effects of phytochemical variation in quaking aspen *Populus tremuloides* clones on gypsy moth, *Lymantria dispar*, performance in the field and laboratory / T.L. Osier, S-Y. Hwang, R.L. Lindroth // *Ecological Entomology*. – 2000. – 25. – P. 197 – 207.

Osier, T.L. Long-term effects of defoliation on quaking aspen in relation to genotype and nutrient availability: plant growth, phytochemistry and insect performance / T.L. Osier, R.L. Lindroth // *Oecologia*. – 2004. – V. 139. – P. 55 – 65.

Parry, D. Responses of an insect folivore and its parasitoids to multiyear experimental defoliation of aspen / D. Parry, D. A. Herms, W. J. Mattson // *Ecology*. – 2003 – V. 84. – P. 1768 – 1783.

Ponnuvel, K.M. In vitro antiviral activity of an alkaline trypsin from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus / K.M.

Ponnuvel, K. Nithya, S. Sirigineedi, A.K. Awasthi, M. Yamakawa // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. – 2012. – 81(2). – P. 90 – 104.

Pontoppidan, P. Purification and characterization of myrosinase from the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*), a brassica herbivore / P. Pontoppidan, B. Ekbom, S. Eriksson, J. Meijer // European Journal of Biochemistry. – 2001. – 268. – P. 1041 – 1048.

Rahman, M.M. Cell-free immune reactions in insects / M.M. Rahman, G. Ma, H.L. Robets, O. Schmidt // Journal of Insect Physiology. – 2006. – 52. – P. 754 – 762.

Rantala, M. J. An analysis of trade-off in immune function, body size and development time in the Mediterranean field cricket, *Gryllus bimaculatus* / M. J. Rantala, D.A. Roff // Functional Ecology. – 2005. – 19. – P. 323 – 330.

Rantala, M. J. Inbreeding and extreme outbreeding cause sex differences in immune defence and life history traits in *Epirrita autumnata* / M. J. Rantala, D.A. Roff // Heredity. – 2007. – 98. – P. 329 – 336.

Rapley, L.P. Constitutive or induced defences - how does *Eucalyptus globulus* defend itself from larval feeding? / L.P. Rapley, G.R. Allen, B.M. Potts, N.W. Davies // Chemoecology. – 2007. – 17(4). – P. 235 – 243.

Rask, L. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae / L. Rask, E. Andréasson, B. Ekbom, S. Eriksson, B. Pontoppidan, J. Meijer // Plant Molecular Biology. – 2000. – 42. – P. 93 – 113.

Raymond, B. The role of food plant and pathogen-induced behaviour in the persistence of a nucleopolyhedrovirus / B. Raymond, S.E. Hartley, J.S. Cory, R.S. Hails // Journal of Invertebrate Pathology. – 2005. – 88. – P. 49 – 57.

Reynolds, O.L. Silicon-augmented resistance of plants to herbivorous insects: a review / O.L. Reynolds, M.G. Keeoing, J.H. Meyer // Annals of Applied Biology. – 2009. – 155. – P. 171 – 186.

Roberts, M.R. Seduced by the dark side: integrating molecular and ecological perspectives on the influence of light on plant defence against pests and

pathogens / M.R. Roberts, N.D. Paul // *New Phytologist*. – 2006. – 170(4). – P. 677 – 699.

Roda, A. Individual variability in herbivore-specific elicitors from the plant's perspective / A. Roda, R. Halitschke, A. Steppuhn, I.T. Baldwin // *Molecular Ecology*. – 2004. – 13. – P. 2421 – 2433.

Roden, D.B. Rapid induced resistance and host species effects on gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.): implications for outbreaks on three tree species in the boreal forest / D.B. Roden, W.J. Mattson // *Forest Ecology and Management*. – 2008. – 255. – P. 1868 – 1873.

Ross, A.F. Systematic acquired resistance induced by localized virus infections in plants / A.F. Ross // *Virology*. – 1961. – V.14. – P. 340 – 358.

Ruuhola, T. Foliar oxidases as mediators of the rapidly induced resistance of mountain birch against *Epirrita autumnata* / T. Ruuhola, S. Yang, V. Ossipov, E. Haukioja // *Oecologia*. – 2008. – 154(4). – P. 725 – 730.

Ruuhola, T. Immunological memory of mountain birches: the effects of phenolics on the performance of the autumnal moth depend on the herbivory history of trees / T. Ruuhola, J-P. Salminen, S. Haviola, S. Yang, M.J. Rantala // *Journal of Chemical Ecology*. – 2007. – 33. – P. 1160 – 1176.

Salminen, J-P. Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry / J-P. Salminen, V. Ossipov, J. Lojonen, E. Haukioja, K. Pihlaja // *Journal of Chromatography A*. – 1999. – 864. – P. 283 – 291.

Satoh, D. Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*: purification, characterization and cDNA cloning / D. Satoh, A. Horii, M. Ochiai, M. Ashida // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – 274. – P. 7441 – 7453.

Schneider, D. Physiological integration of innate immunity / D. Schneider // In: Rolff, J., Reynolds, S. (Eds.), *Insect Infection and Immunity*. - Oxford: Oxford University Press. – 2009. – P. 106–116.

Schoonhoven, L. M. *Insect-Plant Biology* / L. M. Schoonhoven, J. J. A. Van Loon, M. Dicke. – Oxford: Oxford University Press, 2005. – 421 p.

Schowalter, T. D. *Insect Ecology: an Ecosystem Approach*, 2 nd Ed. / T. D. Schowalter. – San Diego: Elsevier/Academic. – 572 p.

Scriber, J.M. Growth of herbivorous caterpillars in relation to feeding specialization and to the growth from of their food plants / J.M. Scriber, P. Feeny // *Ecology*. – 1979. – V. 60. – P. 829 – 850.

Scriber, J.M. The nutritional ecology of immature insects / J.M. Scriber, F.Jr. Slansky // *Annual Review of Entomology*. – 1981. – V. 26. – P. 183 – 211.

Seitz, V. Identification of immunorelevant genes from greater wax moth (*Galleria mellonella*) by a subtractive hybridization approach / V. Seitz, A. Clermont, M. Wedde, M. Hummel, A. Vilcinskas, K. Schlatterer, L. Podsiadlowski // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2003. – 27. – P. 207 – 215.

Shin, S.W. Two carbohydrate recognition domains of *Hyphantria cunea* lectin bind to bacterial lipopolysaccharides through O-specific chain / Sa.W. Shina, D-S.Parka, S.C. Kimb, H-Y. Park // *FEBS Letters*. – 2000. – 467. – P. 70 – 74.

Sivamani, E. Influence of some plant phenolics on the activity of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae* on *Heliothis armigera* / E. Sivamani, N. Rajendran, R. Senrayan, T.N. Ananthakrishnan, K. Jayaraman // *Entomologia Experimentalis et Applicata*. – 1992. – V. 63. – 3. – P. 243 – 248.

Smilanich, A.M. Immunological cost of chemical defence and the evolution of herbivore diet breadth / A.M. Smilanich, L.A. Dyer, J.Q. Chambers, M.D. Bowers // *Ecology Letters*. – 2009. – 12(7). – P. 612 – 621.

Smith, J.L. Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants / J.L. Smith, C.M. DeMoraes, M.C. Mescher // *Pest Management Science*. – 2009. – 65 (5). – P. 497 – 503.

Smith, S.M. Biological control with trichogramma: advances, successes, and potential of their use / Smith S.M // *Annual Review of Entomology*. – 1996. – 41. – P. – 375 – 406.

Steinkraus, D. Fungal Pathogens of Insects / D. Steinkraus // In: Capinera, J. L. (ed.), *Encyclopedia of Entomology*. – Netherlands: Kluwer Academic Publishers. – 2004. – P. 929–935.

Stockhoff, B.A. Ontogenetic change in dietary selection for protein and lipid by gypsy moth larvae / B.A. Stockhoff // *Journal of Insect Physiology*. -1993. – 39. – P. 677 – 686.

Stout, M.J. Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods / M.J. Stout, J.S. Thaler, B.P. Thomma // *Annual Review of Entomology*. – 2006. – 51. – P. 663 – 669.

Tanaka, H. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori* / H. Tanaka, J. Ishibashi, K. Fujita, Y. Nakajima, A. Sagisaka, K. Tomimoto, N. Suzuki, M. Yoshiyama, Y. Kaneko, T. Iwasaki, T. Sunagawa, K. Yamaji, A. Asaoka, K. Mita, M. Yamakawa // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2008. – 38. – P. 1087 – 1110.

Tanaka, H. A novel Rel protein and shortened isoform that differentially regulate antibacterial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori* / H. Tanaka, M. Yamamoto, Y. Moriyama, M. Yamao, S. Furukawa, A. Sagisaka, H. Nakazawa, H. Mori, M. Yamakawa // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2005. – 1730. – P. 10 – 21.

Textor, S. Herbivore induction of the glucosinolate-myrosinase defense system: major trends, biochemical bases and ecological significance / S. Textor, J. Gershenzon // *Phytochemistry Reviews*. – 2009. – 8. – P. 149 – 170.

Thaler, J. S. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk / J.S. Thaler, P.T. Humphrey, N.K. Whiteman // *Trends in Plant Science*. – 2012. – 17(5). – P. 260 – 270.

Trewhella, K.E. Insect induced resistance in Lodgepole pine: effects on two pine feeding insects / K. E. Trewhella, S. R. Leather, K. R. Day // *Journal of Applied Entomology*. – 1997. – 121. – P. 129 – 136.

Trudeau, D. Central role of hemocytes in *Autographa californica* M nucleopolyhedro-virus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* /

D. Trudeau, J. O. Washburn, L. E. Volkman // *Journal of Virology*. – 2001. – 75. – P. 996 - 1003.

Turlings, T. C. J. Isolation and identification of allelochemicals that attract the larval parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Cresson), to the microhabitat of one of its hosts / T.C.J. Turlings, J.H. Tumlinson, R.R. Heath, A.T. Proveaux, R.E. Doolittle // *Journal of Chemical Ecology*. – 1991. – 17. – P. 2235 – 2251.

Van Frankenhuyzen, K. Forest defoliators / K. Van Frankenhuyzen, R. C.Reardon, N. R. Dubois // In: Lacey L. A. and Kaya H. K. (eds.), *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Dordrecht: Springer. – 2007. P. – 481-504

Van Loon, L.C. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria / L.C. Van Loon, P.A. Bakker, C.M.J. Pieterse // *Annual Review of Phytopathology*. – 1998. – 36. – P. 453 – 483.

Van Munster, M. Can plants use an entomopathogenic virus as a defence against herbivore / M. Van Munster, A. Janssen, A. Clérivet, J. Van Den Heuvel // *Oecologia*. – 2005. – 143. – P. 396 – 401.

Vasta, G.R. C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway / G.R. Vasta, M. Quesenberry, H. Ahmed, N. O'Leary // *Developmental and Comparative Immunology*. – 1999. – 23. – P. 401 – 420.

Vilcinskas, A. Effect of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae (Lepidoptera: Pyralidae) / A. Vilcinskas, V. Matha // *European Journal of Entomology*. – 1997. – 94. – P. 461 – 472.

Von Dahl, C.C. Deciphering the role of ethylene in plant–herbivore interactions / C.C. Von Dahl, I.T. Baldwin // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2007. – 26. – P. 201 – 209.

Vuorinen, T. *Epirrita autumnata* induced VOC emission of silver birch differ from emission induced by leaf fungal pathogen / T. Vuorinen, A-M. Nerg, L. Syrja, P. Peltonen, J.K. Holopainen // *Arthropod-Plant Interaction*. – 2007. – 1. – P. 159 – 165.

Wadleigh, R.W. Detoxification of isothiocyanate allelochemicals by glutathione transferase in three lepidopterous species / R.W. Wadleigh, S.J. Yu // *Journal of Chemical Ecology*. – 1988. – 14. – P. 1279 – 1288.

Walling, L. L. The myriad plant responses to herbivores / L. L. Walling // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2000. – V. 19. – 195 – 216.

Wallner, W. E. Host defoliation: A possible determinant of gypsy moth population quality / W.E. Wallner, G.S. Walton // *Annals of the Entomological Society of America*. – 1979. – 72. – P. 62 – 67.

Wang, Y. Binding properties of the regulatory domains in *Manduca sexta* hemolymph proteinase-14, an initiation enzyme of the prophenoloxidase activation system / Y. Wang, H. Jiang // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2010. – 34. – P. 316 – 322.

Wang, Y. Biological activity of *Manduca sexta* paralytic and plasmatocyte spreading peptide and primary structure of its hemolymph precursor / Y. Wang, H. Jiang, M.R. Kanost // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 1999. – 29. – P. 1075 – 1086.

Wang, Y. Proteolytic activation of pro-spätzle is required for the induced transcription of antimicrobial peptide genes in lepidopteran insects / Y. Wang, T. Cheng, S. Rayaprolu, Z. Zou, Q. Xia, Z. Xiang, H. Jiang // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2007. – 31. – P. 1002 – 1012.

War, A.R. Herbivore induced plant volatiles. Their role in plant defense for pest management / A.R. War, H.C. Sharma, M. G. Paulraj, M.Y. War, S. Ignacimuthu // *Plant signaling and behavior*. – 2011. – 6(12). – P. 1973 – 1978.

War, A.R. Mechanisms of Plant Defense against Insect Herbivores / A.R. War, M.G. Paulraj, T. Ahmad, A.A. Buhroo, B. Hussain, S. Ignacimuthu, H.C. Sharma // *Plant signaling and behavior*. – 2012. – 7(10). – P. 1306 – 1320.

Wheat, C.W. The genetic basis of a plant–insect coevolutionary key innovation / C.W. Wheat, H. Vogel, U. Wittstock, M.F. Braby, D. Underwood, T. Mitchell-Olds // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – 104. – P. 20427 – 20431.

Williams, M.J. *Drosophila* Hemopoiesis and Cellular / M.J. Williams // The Journal of Immunology. – 2007. – 178. – P. 4711 – 4716.

Winkler, I. S. The phylogenetic dimension of insect/plant interactions: A summary of recent evidence / I. S. Winkler, C. Mitter // In: Tilmon, K. (ed.), Specialization, Speciation, and Radiation: The Evolutionary Biology of Herbivorous Insects. – Berkeley: University of California Press. – 2008. – P. 240 – 263.

Yoshida, H. Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* / H. Yoshida, K. Kinoshita, M. Ashida // The Journal of Biological Chemistry. – 1996. – 271. – P. 13854 – 60.

Yu, K.H. Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli* / K.H. Yu, K.N. Kim, J.H. Lee, H.S. Lee, S.H. Kim, K.Y. Cho, M.H. Nam, I.H. Lee // Developmental and Comparative Immunology. – 2002. – 26. – P. 707 – 713.

Yu, X.Q. Binding of hemolin to bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. An immunoglobulin superfamily member from insects as a pattern-recognition receptor / X.Q. Yu, M.R. Kanost // European Journal of Biochemistry. – 2002. – 269. – P. 1827 – 1834.

Yu, X.Q. Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to Gram-negative bacteria / X.Q. Yu, M.R. Kanost // The Journal of Biological Chemistry. – 2000. – 275. – P. 37373 – 81.

Yu, X.Q. Immulectin-4 from the tobacco hornworm *Manduca sexta* binds to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid / X.Q. Yu, E. Ling, M.E. Tracy, Y. Zhu // Insect Molecular Biology. – 2006. – 15. – P. 119 – 128.

Yu, X.Q. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma / X.Q. Yu, Y.F. Zhu, C. Ma, J.A. Fabrick, M.R. Kanost // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2002. – 32. – P. 1287 – 1293.

Zangerl, A. R. Theory and pattern in plant defense allocation / A. R. Zangerl, F. A. Bazzaz // In: Fritz, R.S., Simms, E. L. (eds.) Plant Resistance to

Herbivores and Pathogens. Chicago: University of Chicago Press. – 1992. – P. 363–391.

Zhao, L. In search of a function for hemolin, a hemolymph protein from the immunoglobulin superfamily / L. Zhao, M.R. Kanost // Journal of Insect Physiology. – 1996. – 42. – P. 73 – 79.