

**На правах рукописи**

**ДУБОВСКИЙ ИВАН МИХАЙЛОВИЧ**

**Эволюция резистентности вошинной огневки *Galleria mellonella* (L.)  
к энтомопатогенным бактериям и грибам**

**03.02.05 – энтомология**

**АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук**

**Новосибирск – 2015**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук в лаборатории патологии насекомых.

**Научный консультант:** доктор биологических наук, профессор  
**Глунов Виктор Вячеславович**

**Официальные оппоненты:** **Галактионов Кирилл Владимирович**  
доктор биологических наук, профессор,  
федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Зоологический Институт  
РАН (г. Санкт-Петербург), главный научный  
сотрудник

**Атаев Геннадий Леонидович**  
доктор биологических наук, профессор,  
федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования  
«Российский государственный  
педагогический университет им. А.И.  
Герцена» (г. Санкт-Петербург), кафедра  
зоологии, заведующий кафедрой

**Штерншис Маргарита Владимировна**  
доктор биологических наук, профессор,  
федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования  
«Новосибирский государственный аграрный  
университет», (г. Новосибирск), кафедра  
защиты растений, профессор

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение «Всероссийский  
научно-исследовательский институт защиты  
растений» (г. Санкт-Петербург, Пушкин)

Защита диссертации состоится 9 февраля 2016 г. в 10 часов на заседании диссертационного  
совета Д 003.033.01 при Институте систематики и экологии животных СО РАН по адресу:  
630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 11. Факс: (383) 217-09-73, e-mail: dis@eco.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института систематики и экологии  
животных СО РАН и на сайте института [www.eco.nsc.ru](http://www.eco.nsc.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного  
совета, кандидат биологических наук



Петрожицкая  
Людмила Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Коэволюционные взаимоотношения, при которых изменения признаков у одних видов ведут к трансформациям других видов (Тимофеев-Ресовский и др., 1977), наиболее ярко проявляются в системах паразит-хозяин (Беклемишев 1970; Шмальгаузен 1983). Многогранные взаимоотношения и взаимное влияние составляющих этих систем, а также невероятная динамичность и зависимость от внешних условий говорят о том, что для ее устойчивого существования необходимы постоянные эволюционные преобразования как хозяина, так и его паразита (Lively, 1996). Паразит-хозяинные системы эволюционно лабильны, а любой «перевес» в виде развития новых признаков или адаптаций может вывести систему из равновесия, вызвать увеличение давления фактора отбора и, как следствие, привести к быстрому закреплению новых признаков, изменению или разрушению паразит-хозяинной системы. Считается, что эволюция паразитизма может идти как по пути увеличения специализации к хозяевам, так и по пути генерализации. У паразитов-специалистов приуроченность к одному хозяину или их узкому кругу ведет к формированию адаптаций, направленных на поддержание баланса между уровнем вирулентности и суммарной трансмиссией потомства, то есть поддерживается средний уровень вирулентности, оптимальный для размножения паразита (Leggett et al., 2013). Эволюция по пути генерализации приводит к расширению круга хозяев и увеличению экологической пластичности, но сопровождается снижением вирулентности. Яркими представителями видов-генералистов являются грибы *Metarhizium robertsii*, *Beauveria bassiana* и бактерии *Bacillus thuringiensis* (БТ). Эти патогенные для насекомых микроорганизмы широко распространены в биоценозах, а также активно используются для создания биологических средств защиты растений от насекомых-вредителей сельского и лесного хозяйства. Данные патогены обладают широким спектром разнообразных факторов вирулентности, способны вызывать заболевания у насекомых различных отрядов и приводят к эпизоотиям (Штейнхауз 1952; Глупов и др., 2001; Augustyniuk–Kram, Kram, 2012). Для многих микроорганизмов, в том числе грибов родов *Beauveria*, *Metarhizium* и бактерий БТ, развитие патогенов проходит через биотрофную и некротрофную фазы. При развитии в организме хозяина происходит подавление всех защитных систем, затем колонизация, так называемая биотрофная фаза, после чего наступает некротрофная фаза развития микроорганизмов, которая реализуется на погибшем хозяине и необходима для формирования дочернего поколения патогенов (Vega et al., 2009).

Расширение круга хозяев и увеличение экологической пластичности патогенов не снижает значимости биотрофной фазы, которая в ряде случаев является определяющей в существовании данных видов микроорганизмов. В частности, в биотрофной фазе на паразитические микроорганизмы более существенное влияние оказывает непосредственно хозяин (как среда первого порядка), по сравнению с действием окружающей среды, с которой паразит взаимодействует опосредованно (Глупов и др., 2001). Соответственно,

сложность и действенность влияния организма хозяина на паразита будет определяться как физиологическим состоянием организма хозяина, так и его реактивностью, которая состоит из комплекса систем, отвечающих за резистентность хозяина к паразиту (иммунная, детоксицирующая, антиоксидантная и др.).

У насекомых, как представителей членистоногих, внешние покровы и открытая кровеносная система являются определяющими в формировании защиты против широкого круга энтомопатогенов. Защитные свойства кутикулы насекомых характеризуются ее толщиной, составом и различными биохимическими особенностями (St. Leger et al., 1988; Bogus et al., 2007; Ment et al., 2010). Среди патогенов, проникающих через кутикулу, наиболее распространены энтомопатогенные аскомицеты. В частности, для грибов родов *Beauveria* и *Metarhizium* характерно проникновение через покровы, хотя они также могут проникать через кишечник, что считается для них нетипичным (Hajek, Stleger, 1994; Борисов и др., 2001). Конидии грибов прикрепляются к поверхности эпикуткулы за счет гидрофобных взаимодействий, активируются и прорастают через кутикулу, используя механическое давление и гидролитические «ферменты атаки» (Chamley, 2003). В полости тела хозяина грибы начинают размножаться и продуцируют токсины, в том числе циклические пептиды, подавляющие иммунный ответ насекомого (Vilcinskas et al., 1997).

Основная масса паразитов, в частности, бактерий, не в состоянии проникнуть в организм насекомых через покровы, за исключением случаев септических ранений, а также бактерий, переносимых паразитическими насекомыми и нематодами. Тем не менее, бактериальные заболевания распространены среди насекомых и нередко приводят к эпизоотиям. Это вызвано тем, что бактерии приспособились проникать в организм хозяина через кишечник. Передний и задний отделы кишечника выстилает кутикула, а эпителиальные клетки среднего отдела защищает только перитрофическая мембрана. В связи с этим, данный отдел чаще всего используется бактериальными патогенами для проникновения. При этом можно отметить, что на начальных этапах инфекции, вызываемой кристаллообразующими бактериями, прямого взаимодействия клеток БТ с эпителием не происходит, а патогенные свойства бактерий реализуются за счет метаболитов, которые способны нарушать функционирование кишечника и вызывать кишечный токсикоз. В дальнейшем при нарушении функционирования и целостности эпителиальных клеток бактерии проникают в гемоцель, приводя к конечной стадии бактериоза, а именно септицемии (Raymond et al., 2010). Среди токсинов, выделяемых БТ, существенное значение в возникновении кишечного бактериоза отводится Сгу-токсинам, содержащимся в кристаллах, которые представляют собой протоксины, активирующиеся в результате ограниченного протеолиза в кишечнике насекомого (Pardo-Lopez et al., 2013). Кроме того, на эпителиальные клетки в кишечнике могут влиять и другие токсины БТ (Cyt, Vip белки, фосфолипазы, гемолизины, энтеротоксины, металлопротеазы), что в

комплексе с Cry-токсинами ведет к разрушению кишечника (Nielsen-LeRoux et al., 2012).

Следует отметить, что как только паразит «проходит» кутикулярный и/или кишечный барьер, запускаются защитные реакции хозяина в гемоцеле (Hajek, St. Leger, 1994). Паразиты могут быть фагоцитированы или инкапсулированы гемоцитами, при этом на поверхности капсулы происходит образование меланинов, обладающих антимикробными свойствами (St. Leger et al., 1988). Кроме того, активируется фенолоксидаза (ФО) гемолимфы, благодаря чему запускается процесс меланогенеза, во время которого происходит выброс активированных кислородных метаболитов (АКМ) (Nappi, 1993; Глупов и др., 2001; Komarov et al., 2009). Одновременно в жировом теле и ряде других органов и тканей происходит синтез антимикробных белков (АМБ) (Yan et al., 2005). У насекомых синтезируется широкий спектр АМБ, подавляющее большинство которых обладает антибактериальной активностью, а некоторые демонстрируют фунгицидные или фунгистатические свойства (Vilcinskas, Matha, 1997; Xu et al., 2012). Разрушение клеток насекомых при воздействии токсинов, генерация АКМ при меланогенезе и нарушения метаболизма при инфекции приводят к отклонениям в окислительно-восстановительном (ОВ) балансе и накоплению токсичных метаболитов в организме заражённых особей (Глупов и др., 2001; Cerenius, Soderhall, 2004). За поддержание ОВ баланса, детоксикацию и инактивацию токсичных веществ отвечают антиоксидантная и детоксицирующая системы (Зенков и др., 2001).

На различных этапах коэволюционных взаимоотношений паразита и хозяина происходит своеобразная "эволюционная гонка вооружений", при которой отбор в популяции хозяина может быть направлен на формирование новых или значительное усиление уже имеющихся механизмов резистентности, а паразит развивает факторы вирулентности. Однако, в настоящее время, наше понимание микроэволюционных стратегий формирования резистентности и их вклада в коэволюционные взаимоотношения в системе паразит-хозяин весьма ограничено. Остается открытым вопрос о роли этих процессов в адаптивной радиации хозяев, а также об их влиянии на специализацию и факторы вирулентности паразита. Не охарактеризованы основные защитные реакции и системы участвующие в формировании резистентности к энтомопатогенным грибам в ходе микроэволюции. Не известен вклад реакций клеточного и гуморального иммунитета, регенерационных процессов, а также антиоксидантной и детоксицирующей систем при развитии устойчивости к бактериям. Отсутствуют обобщающие сведения об общих тенденциях в ходе микроэволюции резистентности насекомых к бактериальным и грибным энтомопатогенам.

**Степень разработанности темы.** Исследования формирования резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам в ходе микроэволюции практически отсутствуют, хотя известно, что внутривидовые отличия в устойчивости к грибам могут быть связаны с повышенной экспрессией фенолоксидаз, проявляющейся в виде меланизма у насекомых (Wilson et al.,

2001). Кроме того, при развитии грибных патогенов у насекомых малоизученным остается защитный потенциал отдельных индуцибельных механизмов, таких как: синтез АМБ, ФО активность, инкапсуляция и генерация АКМ. Известно, что эволюция резистентности насекомых к токсинам БТ связана с мутационными изменениями генов, кодирующих рецепторы к этим факторам – кадеринов, N-аминопептидаз и щелочных фосфатаз (Ferre, Van Rie, 2002). Данные приспособления наиболее часто возникают в популяциях насекомых, питающихся трансгенными растениями, содержащими Cry-токсины БТ (Griffitts, Aroian, 2005). Однако, в естественных биоценозах насекомые сталкиваются не только с  $\delta$ -эндотоксином (Cry), но и с вегетативными клетками БТ и широким набором их токсинов, вследствие чего эволюция резистентности может пойти по нескольким путям. В этой связи, для полноценного и глубокого понимания процессов, лежащих в основе формирования устойчивости насекомых, важен анализ эволюции резистентности с участием всего комплекса факторов вирулентности энтомопатогенов. В настоящее время, к сожалению, такие исследования единичны (Ericsson et al., 2009).

Таким образом, микроэволюционные особенности формирования резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам не изучены. Практически не изучен вклад иммунной и антиоксидантной систем в развитие устойчивости насекомых к бактериям БТ. Кроме того, полностью открыт вопрос о микроэволюционных стратегиях, приводящих к возникновению устойчивых форм к грибам *Beauveria*, бактериям БТ и «цене» резистентности для популяций насекомых.

**В связи с вышеизложенным, основная цель работы:** выяснение иммуно-физиологических адаптаций при формировании резистентности воцинной огневки *Galleria mellonella* к энтомопатогенным бактериям *Bacillus thuringiensis* и грибам *Beauveria bassiana* в ходе микроэволюции.

#### **Задачи исследования:**

1. Охарактеризовать вклад реакций клеточного и гуморального иммунитета, антиоксидантной и детоксицирующей систем в организме воцинной огневки при развитии бактериальной инфекции *Bacillus thuringiensis*.
2. Проанализировать внутривидовые защитные стратегии у популяции воцинной огневки с врожденной устойчивостью к грибам *Beauveria bassiana*.
3. Изучить комплекс иммуно-физиологических адаптаций в организме воцинной огневки при формировании резистентности к *B. thuringiensis* в ходе направленного отбора.
4. Охарактеризовать кутикулярные, клеточные и гуморальные защитные реакции у личинок воцинной огневки, селектированных на устойчивость к *B. bassiana*.
5. Оценить морфометрические и популяционные показатели (вес, выживаемость, длительность развития, вес куколок, плодовитость) у

насекомых, с повышенной устойчивостью к бактериям *B. thuringiensis* и грибам *B. bassiana*.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Устойчивость личинок вощиной огневки к энтомопатогенным бактериям *B. thuringiensis* формируется за счет комплекса реакций иммунной системы (клеточных и гуморальных), а также активности компонентов антиоксидантной системы.
2. Эволюция резистентности насекомых к бактериям *B. thuringiensis* направлена на развитие иммуно-физиологических механизмов инактивации бактериальных токсинов в кишечнике, усиление процессов репарации, антиоксидантной защиты и повышение экспрессии антимикробных белков в организме.
3. Насекомые с повышенным уровнем меланизации в кутикуле характеризуются более высокой устойчивостью к энтомопатогенным грибам, которая формируется за счет защитных реакций клеточного иммунитета, морфологических и биохимических особенностей кутикулы.
4. Формирование устойчивости насекомых к грибам *B. bassiana* в ходе микроэволюции связано с усилением защитных функций покровов за счет комплекса иммунных реакций, направленных на сдерживание патогена на уровне покровов, т.е. «кутикулярного барьера».

**Научная новизна работы.** Впервые зарегистрировано, что развитие бактериоза, вызванного *B. thuringiensis*, приводит к нарушению окислительно-восстановительного баланса в организме насекомых. Выявлено участие антимикробных белков в защите насекомых от бактериальной инфекции *B. thuringiensis*. Обнаружено, что развитие сублетальной и острой бактериальной инфекции приводит к активации экспрессии АМБ как локально - в кишечнике, так и системно - в жировом теле заражённых особей. Впервые на вощиной огневке проведены эксперименты по сайленсингу генов с помощью РНК-интерференции. Установлено, что подавление экспрессии гловерина, индуцибельного ингибитора металлопротеаз (ИМРІ) и глутатион пероксидазы увеличивает восприимчивость насекомых к бактериальной инфекции, вызванной БТ. Получены оригинальные данные о вкладе ИМРІ и регенерационных процессов в механизмы резистентности вощиной огневки *G. mellonella* на ранних этапах бактериоза, вызванного БТ. Охарактеризованы иммуно-физиологические защитные реакции в кишечнике при эволюции резистентности насекомых к БТ. В частности, у насекомых устойчивой линии происходит повышение защитных реакций в кишечнике, направленных на инактивацию бактериального эндотоксина и вегетативных клеток БТ, АКМ, а также на регенерацию тканей. Изучен состав бактериального сообщества кишечника и его структурные изменения при бактериозе, вызванном БТ. Впервые изучены особенности реализации противогрибной защитной стратегии, связанной с повышенным меланизмом личинок *G. mellonella*.

Впервые проведена селекция насекомых из отряда Lepidoptera на устойчивость к грибу *B. bassiana*. Показано, что эволюция резистентности к энтомопатогенным грибам приводит к усилению как неспецифических, так и специфических защитных реакций, усиливающих барьерные функции покровов.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты полученные в данной работе могут быть использованы для дальнейших научных исследований основных защитных систем при развитии резистентности насекомых к энтомопатогенным микроорганизмам. Предложенные модели и подходы являются универсальными для изучения широкого спектра патогенов насекомых, а также процессов коэволюции в системах паразит-хозяин. Кроме того, данные по формированию резистентности насекомых к энтомопатогенам имеют ключевое значение для разработки и усовершенствования стратегий и методов контроля численности насекомых вредителей сельского и лесного хозяйства. В частности, на основе результатов, показывающих увеличение чувствительности насекомых к бактериям *B. thuringiensis* при подавлении антимикробных белков, ингибиторов металлопротеаз и компонентов антиоксидантной системы, могут быть разработаны рекомендации по созданию новых технологий и средств защиты растений с применением различных иммуносупрессоров насекомых. Результаты, представленные в диссертации, могут быть использованы для подготовки курсов лекций по энтомологии, микробиологии, паразитологии, эволюции и защите растений.

**Методология и методы диссертационного исследования.** В качестве экспериментальных моделей использовали линии вощиной огневки, для которых был проведен направленный отбор по принципу устойчивости к бактериям БТ и грибу *B. bassiana*, а также морфу с врожденным меланизмом. Заражение спорокристаллической суспензией бактерий *Bacillus thuringiensis ssp. galleriae* проводили перорально, а конидиями грибов *B. bassiana* и *M. robertsii* - перкутанно (Dubovskiy et al., 2008a, b, 2013b). Для идентификации бактериального сообщества при бактериозе БТ было проведено секвенирование регионов V3-V4 гена 16S рРНК. Биоинформатический анализ полученных сиквенсов был выполнен с помощью пакета программ CloVR-16S версия 1.1 (Angiuoli et al., 2011). Показатели клеточного и гуморального иммунитета, толщину кутикулы и ФО активность в покровах определяли по общепризнанным методикам с модификациями, разработанными в лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН (Дубовский и др., 2011, Dubovskiy et al., 2011, 2013). Уровень АКМ, малонового диальдегида, активность антиоксидантов определяли фотометрически и флуориметрически (Dubovskiy et al., 2008). В работе использовали метод ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) и РНК-интерференции для анализа активности различных генов, участвующих в иммунном ответе, антиоксидантной защите и регенерационных процессах (Dubovskiy et al., 2013a, b). Для расчетов статистической значимости различий

изучаемых параметров использовали программы Statistica 6.0, StatPluse 2009 и GraphPad Prism 5.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов определяется использованием современных стандартных методов подготовки и анализа исследуемых показателей у насекомых. Изменение активности защитных систем насекомых с различной устойчивостью к энтомопатогенам подтверждено как биохимическими, так и молекулярно-генетическими методами. Достоверность отличий в резистентности линий насекомых к бактериальным и грибным патогенам подтверждается использованием репрезентативных выборок и стандартизированных способов заражения. Новизна обнаруженных механизмов резистентности насекомых и направлений микроэволюционных процессов подтверждается совокупностью результатов по анализу устойчивости экспериментальных линий насекомых, популяционных показателей, локализации и роли защитных реакций при различных инфекциях и сравнением полученных результатов с литературными данными. Методическая база проведенных исследований адекватна поставленным задачам, собранные данные обработаны корректными статистическими методами.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на XII и XIV съездах Русского Энтомологического общества (Санкт-Петербург, 2002, 2012), на IV и V съездах Паразитологического общества РАН «Паразитология в XXI веке: проблемы, методы, решения» (Санкт-Петербург, 2008; Новосибирск, 2013), съездах Королевского энтомологического общества «Иммунитет насекомых» (Великобритания: Шеффилд, 2009; Суонси, 2010; Йорк, 2014), III Межрегиональной научной конференции паразитологов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, 2009), VII и IX европейском конгрессе энтомологов (Греция, 2002; Венгрия, 2010), VIII Межрегиональном совещании энтомологов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, 2010), 38-, 39-, 45- и 46-м ежегодных конгрессах по патологии беспозвоночных животных (США, Анкоридж, 2005; Китай, Вухань, 2006; Аргентина, Буэнос-Айрес, 2012; Германия, Майнц, 2014), III Международной конференции по модельным системам (Греция, Ханья, 2015), межлабораторных семинарах ИСиЭЖ СО РАН (2013, 2014).

**Публикации.** Основные результаты диссертационной работы отражены в 41 опубликованной работе, в том числе 40 статей в научных журналах, включенных в Перечень ВАК РФ (из них 24 статьи в журналах, входящих в библиографическую базу Web of Science) и 1 патент РФ.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 287 страницах текста, включает введение, 5 глав, заключение, выводы и приложение. Работа иллюстрирована 68 рисунками и 2 таблицами. Список литературы включает 451 источника, из которых 373 на иностранных языках.

**Личный вклад соискателя.** Литературный анализ, формулировка гипотез и задач исследования. Постановка моделей экспериментальной эволюции и меланизма на вошинной огневке. Биохимические и молекулярно-генетические исследования иммунного ответа при бактериозах и микозах насекомых. Статистическая и биоинформатическая обработка результатов. Формулировка всех выводов. Написание статей. Ключевые результаты диссертации по защитным реакциям вошинной огневки при различных патогенезах и эволюции резистентности насекомых представлены в публикациях, где автор диссертации является первым автором (Дубовский и др., 2005; 2006; 2010; 2011; 2013; Dubovskiy et al., 2008 a,b; 2010; 2011, 2013 a,b).

**Благодарности.** Приношу искреннюю благодарность за помощь на всех этапах подготовки работы своему научному консультанту д.б.н., профессору В.В. Глупову (ИСиЭЖ СОРАН, г. Новосибирск). Неоценимый вклад в организацию и проведение экспериментальной работы внесли к.б.н. Е.В. Гризанова и к.б.н. О.Н. Ярославцева (ИСиЭЖ СОРАН). Выражаю благодарность за ценные замечания к работе д.б.н. В.Ю. Крюкову (ИСиЭЖ СОРАН), д.б.н. Ю.С. Токареву (ВИЗР, г. Санкт-Петербург), д.б.н. Н.Е. Грунтенко (ИЦиГ СО РАН, г.Новосибирск), к.б.н. В.В. Мартемьянову и к.б.н. Я.Л. Воронцовой (ИСиЭЖ СОРАН), д.б.н. Г.В. Беньковской (ИБиГ, г. Уфа), к.б.н. И.А. Слепневой (ИХКиГ СО РАН). За консультативную помощь я глубоко признателен проф. Т.М. Бутту и М. Виттен (ун-т Суонси, Великобритания), проф. А. Вилсинкасу (ун-т Гиссена, Германия) и проф. М. Рантала (ун-т Турку, Финляндия). Я признателен за помощь в подготовке насекомых Н.В. Богомоловой, за идентификацию бактерий к.б.н. Л.И. Бурцевой и к.б.н. В.П. Ходыреву, за ценные советы при постановке различных методик к.б.н. Н.А. Крюковой и всему коллективу лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН.

Работа выполнена при финансовой поддержке проектов СО РАН, РФФИ и Президента РФ.

## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В главе рассмотрены особенности течения бактериозов и микозов у насекомых. Проанализированы основные механизмы конституционального и индуцибельного иммунитета насекомых и критически рассмотрены работы по эволюции резистентности к различным паразитам. Обоснована необходимость изучения различных защитных систем насекомых при анализе взаимоотношений в системах паразит-хозяин.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Объектом исследований являлись личинки большой вошинной огневки *G. mellonella* (L.) лабораторной популяции, ранее собранной в Новосибирской области, обладающие темной окраской кутикулы. При изучении влияния меланизма на устойчивость к грибной инфекции, для сравнения была взята

морфа со светлой окраской кутикулы (ахромисты), полученная из Великобритании (ун-т Суонси, Великобритания). *G. mellonella* – космополитический вид, заселяющий пчелиные семьи в ульях. Гусеницы питаются мёдом, пергой и личинками пчел, тем самым повреждая не только восковые соты, но и расплод, существенно снижая запасы мёда и силу пчелосемей. Биологический контроль численности вошинной огневки осуществляют с помощью бактериальных и грибных препаратов. Кроме того, благодаря успешному воспроизводству в лабораторных условиях, данный объект стал популярной лабораторной моделью, начиная с пионерских работ С.И. Метальникова в начале 20-го века (Штейнхауз, 1952). В настоящее время вошинная огневка является одним из самых распространенных в мире лабораторных объектов для испытания биоинсектицидов, изучения механизмов резистентности насекомых, а также как модельный объект для изучения инфекций теплокровных (Vilcinskas, 2011a; Ramarao et al., 2012; Harding et al., 2013; Mukherjee et al., 2013). Организация иммунной системы вошинной огневки хорошо изучена, описаны важнейшие гены антимикробной, антиоксидантной и детоксицирующей систем, принимающих участие в защите против энтомопатогенных микроорганизмов (Dubovskiy et al., 2008; Jiang et al., 2010; Dubovskiy et al., 2013b). Охарактеризованная иммунная система, короткое время развития, отсутствие диапаузы, а также наличие межлабораторного обмена различными морфами, делает этот вид насекомых удачным объектом для работ по "экспериментальной эволюции", то есть моделированию эволюционных процессов в лабораторных условиях.

Для создания линий вошиной огневки с повышенной устойчивостью к энтомопатогенам был проведен направленный отбор личинок вошинной огневки по принципу устойчивости к бактериям БТ и грибу *B. bassiana*. Исходная популяция вошинной огневки была разделена на группы. Каждую из экспериментальных групп селектировали на устойчивость к грибу и бактерии с помощью последовательного, в чередующихся поколениях, заражения (ЛК<sub>50</sub>) и отбором выживших особей (селектированные линии), контрольные группы оставляли без селекции (контрольные линии).

Заражение спорокристаллической суспензией бактерий *Bacillus thuringiensis ssp. galleriae* проводили перорально, а конидиями грибов *B. bassiana* и *M. robertsii* – перкутанно (Dubovskiy et al., 2008, 2013). Уровень адгезии и прорастания конидий гриба определяли согласно Д. Мент и др. (Ment et al., 2010). Для идентификации бактериального сообщества при бактериозе БТ было проведено секвенирование регионов V3-V4 гена 16S рНК (2x250 bp) на приборе MiSeq Illumina sequencer в ИБХиФМ СОРАН, г. Новосибирск. Биоинформатический анализ полученных сиквенсов был выполнен с помощью пакета программ CloVR-16S версия 1.1 (Angiuoli et al., 2011).

Толщину кутикулы и ФО активность в покровах, общее число гемоцитов, показатели клеточного (фагоцитоз, инкапсуляция, ФО активность в гемоцитах) и гуморального (ФО активность, коагуляция, лизоцим-подобная активность) иммунитета определяли по общепризнанным методикам с модификациями, разработанными в лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН

(Дубовский и др., 2011, Dubovskiy et al., 2011, 2013). Уровень АКМ, малонового диальдегида (МДА), активность антиоксидантов (тиолы, супероксиддисмутазы (СОД), глутатион-S-трансферазы (ГСТ), каталаза) определяли фотометрически и флуорометрически (Dubovskiy et al., 2008)

В работе использовали метод ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) для анализа активности различных генов, участвующих в иммунном ответе, антиоксидантной защите и регенерационных процессах. В качестве референсных использовались гены 18S рРНК (18S rRNA; AF286298) и фактор элонгации трансляции 1-альфа (Elongation Factor 1-alpha, Ef-1a; AF423811) (Dubovskiy et al., 2013а, б).

Для блокирования генов, кодирующих IMPI, Gloverin и FPx, был использован подход по избирательному подавлению экспрессии гена-мишени на стадии транскрипции или трансляции при помощи малых молекул РНК. Для запуска процесса РНК-интерференции использовали двухцепочечные РНК в форме протяженных фрагментов дцРНК (длинные дцРНК, 300-450 п.н.). Дизайн праймеров, соответствующих дцРНК, был выполнен с помощью программ BLAST и Snapdragon. Синтез длинных дцРНК проводился с помощью набора реагентов MEGAscript® T7 Transcription Kit. В качестве контроля использовали дцРНК GFP (green fluorescent protein) и физиологический раствор (0.9% NaCl). Синтезированные дцРНК GFP, IMPI, Gloverin и FPx инъецировали в гемоцель личинок воцинной огневки 4-го возраста (100-1000 нг на личинку) перед заражением бактериями БТ. Уровень подавления экспрессии генов мишеней контролировали с помощью qRT-PCR.

Полученные данные обрабатывали статистически, рассчитывая среднее арифметическое и его ошибку. Для проверки нормальности распределения данных использовали тест Д'Агостино (D'Agostino & Pearson omnibus normality test) и критерий Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk normality test). Для сравнения динамики смертности насекомых при заражении бактериями и грибами использовали метод Каплана-Майера и пробит анализ. Статистическую значимость различий изучаемых параметров для данных с ненормальным распределением определяли с помощью теста Мана-Уитни (Mann-Whitney U-test) и однофакторного дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана (Kruskal-Wallis test with Dunn's test). Часть данных с ненормальным распределением логарифмировали. Для сравнения данных с нормальным распределением использовали Т-Тест, а также однофакторный и многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони (one-way, two-way ANOVA, Bonferroni's test). Для расчетов использовали программы Statistica 6.0, StatPluse 2009 и GraphPad Prism 5.

### **ГЛАВА 3. Основные защитные механизмы воцинной огневки при развитии резистентности к бактериям *B. thuringiensis***

#### **3.1. Бактериальный патогенез и развитие резистентности к *B. thuringiensis***

Для сравнительного анализа иммунного ответа моделировали сублетальную (ЛК<sub>15</sub>) и полулетальную (ЛК<sub>50</sub>) кишечную инфекцию, для чего

насекомых заражали различными концентрациями споро-кристаллической смеси бактерий *Bacillus thuringiensis* (БТ) *ssp. galleriae*.

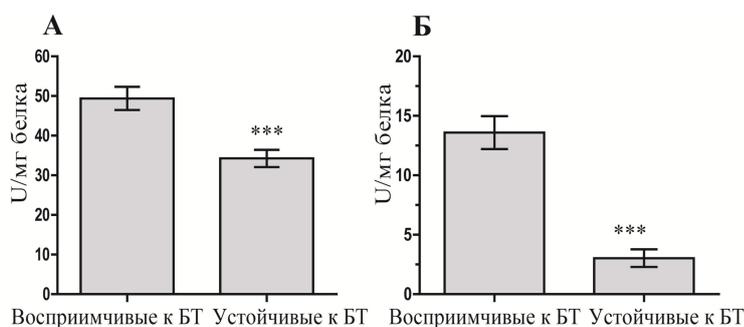
Для создания линии насекомых с повышенной устойчивостью к бактериям БТ была проведена селекция вошинной огневки (20 поколений). Отмечено, что устойчивость к БТ начала формироваться с пятого поколения. Было установлено, что устойчивость селектированных насекомых 20-го поколения достоверно выше ( $p \leq 0.01$ ), чем насекомых контрольной линии. Коэффициент резистентности (RR) насекомых селектированной линии F20 составил 8.8, то есть она была практически в 9 раз устойчивее контрольной линии. Также установлено, что восприимчивость к БТ не возвращается у селектированной линии после трех поколений без действия фактора отбора.

### 3.2. Вес куколок и плодовитость вошинной огневки при формировании резистентности к *B. thuringiensis*

Вес куколок самцов и самок насекомых устойчивой линии был выше, чем у восприимчивой линии ( $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.001$ ). Плодовитость имаго также была выше у насекомых устойчивой линии ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.3. Активация бактериальных Сгу-токсинов и их связывание с рецепторами в кишечнике насекомых

Мы установили, что у насекомых, устойчивых к БТ (селектированная линия), достоверно ниже активность аминопептидаз и щелочных фосфатаз в микроворсинках кишечника (Рисунок 1, А, Б). Известно, что данные ферменты являются рецепторами для Сгу-токсинов БТ (Griffitts, Aroian, 2005). Снижение их активности у насекомых, устойчивых к БТ, может быть вызвано разными причинами, включая изменение их структуры, снижение уровня экспрессии, ингибирование за счет регуляторных молекул (Ferre, Van Rie, 2002; Candas et al., 2003; Ma et al., 2005).



**Рисунок 1.** Активность аминопептидаз-N (А) и щелочных фосфатаз (Б) в эпителиальных клетках кишечника у селектированной линии (устойчивые к *B. thuringiensis* (БТ)) и контрольной линии

(восприимчивые к БТ) насекомых (\*\*\*)  $p \leq 0.001$  по сравнению с восприимчивой линией,  $n=50$  для каждого варианта).

Кроме того, мы впервые установили, что одним из возможных факторов резистентности к БТ выступает индуцибельный ингибитор металлопротеаз (ИМРІ). Так, у устойчивых насекомых в 13 раз повышен уровень экспрессии ИМРІ по сравнению с восприимчивыми (Рисунок 2). Более того, его экспрессия увеличивается при заражении бактериями БТ (Рисунок 6).

Для более детального анализа вклада ИМРІ в защиту от бактериальной инфекции, мы провели эксперимент с подавлением экспрессии (сайленсингом)

IMPI. Сайленсинг генов на посттранскрипционном уровне является результатом разрушения мРНК соответствующих генов. Разрушение мРНК препятствует трансляции и формированию продукта гена. Общий механизм посттранскрипционного сайленсинга генов - это РНК-интерференция (RNAi) – путь с применением интерферирующей дцРНК, синтезированной для определенного гена. Было установлено, что сайленсинг IMPI приводит к достоверному увеличению смертности насекомых при бактериальной инфекции, вызванной БТ ( $p \leq 0.05$ ). Это доказывает защитную роль данного ингибитора протеаз при бактериозе. Мы предполагаем, что концентрация IMPI будет существенно сказываться на протеолитической активации протоксина БТ и/или на его связывании с эпителиальными рецепторами, такими как металлсодержащие протеазы - аминопептидазы. Более того, следует отметить, что IMPI может влиять на сохранение активности АМБ насекомых, за счет блокирования металлопротеаз БТ (InhA1, InhA2, InhA3), которые способны разрушать АМБ (Fedhila et al., 2002; Nielsen-LeRoux et al., 2012).

### **3.4. Процессы регенерации и репарации в кишечнике насекомых при бактериозе *B. thuringiensis***

После активации Cry-токсинов БТ и их связывания с мембранами эпителиальных клеток происходит нарушение функционирования среднего кишечника насекомых и его частичное разрушение (Gill et al., 1992). На данном этапе активную роль могут играть регенерационные и репарационные процессы, которые определяют целостность кишечника и сохранение функциональной активности эпителиальных клеток (Martinez-Ramirez et al., 1999; Loeb et al., 2001). Мы установили, что насекомые устойчивой к БТ линии, имеют в кишечнике повышенный базовый уровень экспрессии ряда контигов (703 и 233), которые относятся к факторам роста и цитокинам (growth-blocking peptide, pleiotrophin-like protein, plasmatocyte-spreading peptide) (Vogel et al., 2011), по сравнению с насекомыми восприимчивой линии (Рисунок 2). При этом развитие бактериоза, вызванном БТ, сопровождается увеличением экспрессии контига 703 и контига 233 в жировом теле и кишечнике насекомых, как устойчивой линии, так и восприимчивой (Рисунок 6); то есть на начальных этапах бактериоза у всех насекомых активируется экспрессия факторов роста, что говорит об увеличении регенерационных процессов.

### **3.5. Иммунный ответ насекомых при бактериозе *B. thuringiensis***

#### **3.5.1. Реакции клеточного и гуморального иммунитета у насекомых при заражении бактериями *B. thuringiensis***

##### *Клеточный иммунный ответ*

Сублетальное и полублетальное заражение насекомых бактериями БТ приводило к достоверному снижению общего числа гемоцитов в гемолимфе по сравнению с контролем ( $p \leq 0.05$ ) (Рисунок 3, А). При сублетальной инфекции мы не зафиксировали достоверных изменений в соотношении ФО-положительных и ФО-отрицательных гемоцитов. Однако при заражении БТ в концентрации ЛК<sub>50</sub> было установлено достоверное снижение числа ФО-положительных гемоцитов (в 1.4 раза) в течение всех трех дней эксперимента ( $p \leq 0.01$ ) (Рисунок 3, В). При заражении сублетальными дозами БТ (ЛК<sub>15</sub>) было

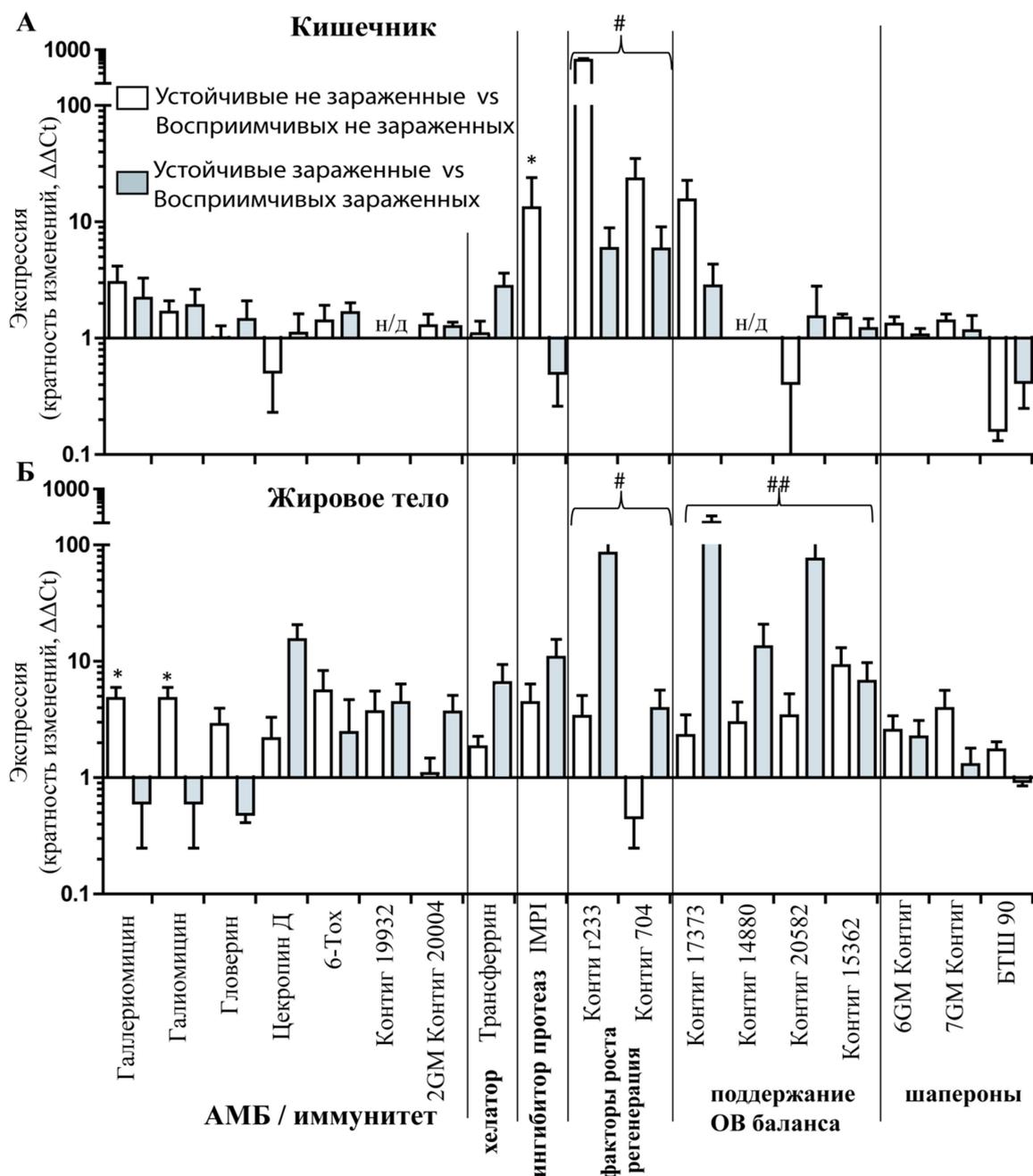
отмечено достоверное увеличение процента фагоцитирующих гемоцитов на вторые ( $p \leq 0.05$ ) и третьи сутки ( $p \leq 0.001$ ) после заражения (Рисунок 3, Б). При полулетальном бактериозе ( $LK_{50}$ ), было отмечено двукратное снижение фагоцитирующей активности гемоцитов на третий день инфекции ( $p \leq 0.05$ ) (Рисунок 3, Б). Установлено, что при сублетальном бактериозе происходит увеличение активности инкапсуляции нейлоновых имплантантов по сравнению с контролем на вторые ( $p \leq 0.05$ ) и третьи сутки ( $p \leq 0.01$ ) после заражения (Рисунок 3, Г). Однако полулетальная инфекция приводила к резкому снижению активности инкапсуляции в гемолимфе зараженных насекомых на вторые ( $p \leq 0.01$ ) и третьи ( $p \leq 0.01$ ) сутки (Рисунок 3, Г).

#### *Гуморальный иммунный ответ*

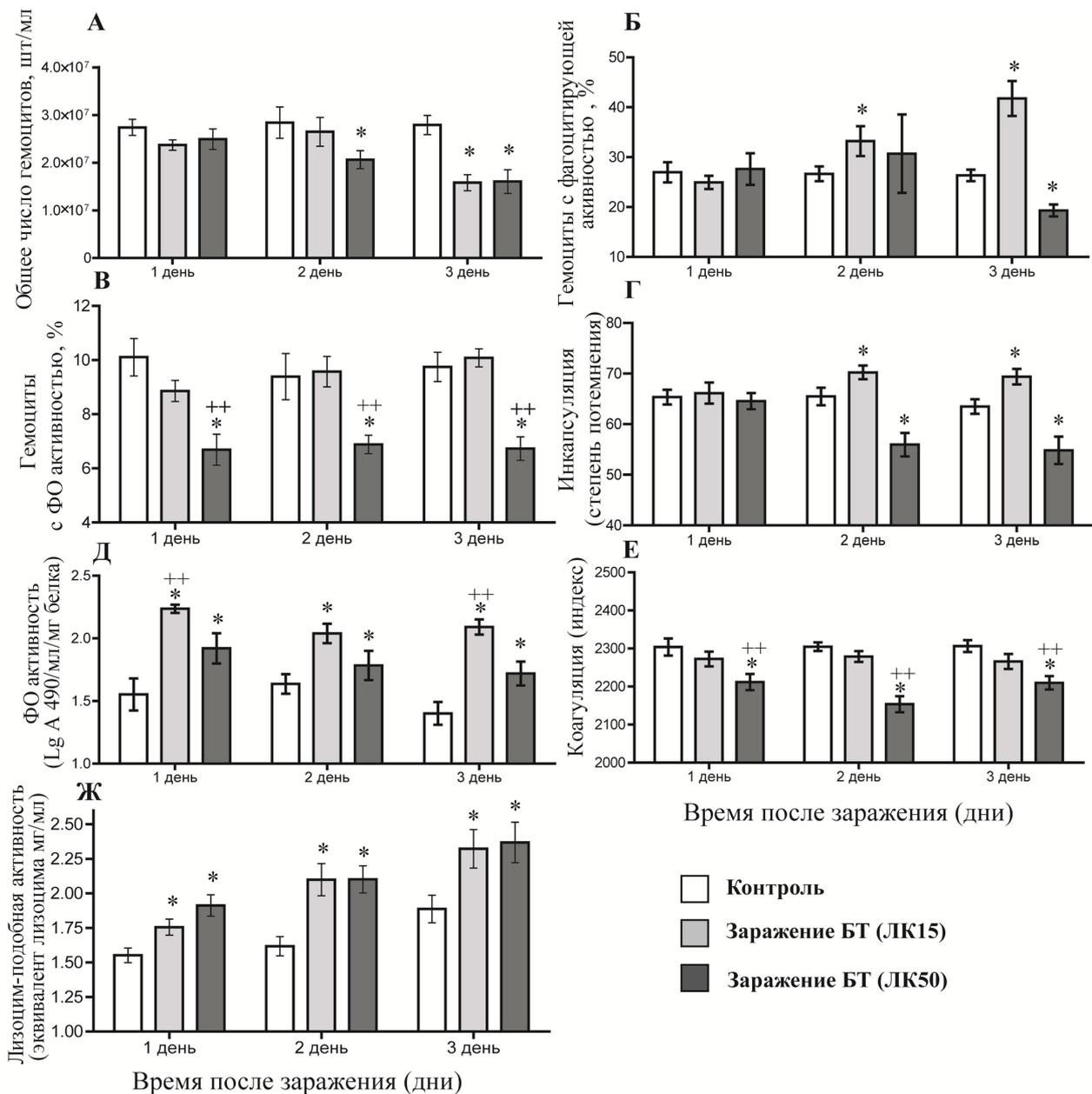
При сублетальной и полулетальной бактериальной инфекции установлено 1.2-1.5-кратное повышение ФО активности в плазме гемолимфы личинок вошинной огневки в течение всего эксперимента ( $p \leq 0.05$ ) (Рисунок 3, Д). Следует отметить, что уровень активации ФО в плазме был достоверно выше при сублетальном заражении, чем при полулетальном на первый ( $p \leq 0.05$ ) и третий ( $p \leq 0.001$ ) дни эксперимента (Рисунок 3, Д). Мы не обнаружили достоверных отличий в коагуляции гемолимфы между контрольными насекомыми и насекомыми, зараженными сублетальной дозой бактерий (Рисунок 3, Е). Однако, полулетальная инфекция приводила к снижению активности коагуляции в течение всех трех суток эксперимента ( $p \leq 0.001$ ) (Рисунок 3, Г). Сублетальный бактериоз приводил к достоверному увеличению лизоцим-подобной активности в гемолимфе по сравнению с контролем ( $p \leq 0.05$ ) (Рисунок 3, Ж). Схожие результаты были получены и при полулетальной инфекции, вызванной БТ ( $p \leq 0.05$ ) (Рисунок 3, Ж).

#### *Уровень экспрессии генов антимикробных белков в жировом теле и кишечнике*

Антимикробные белки являются важнейшим компонентом иммунных реакций насекомых. С помощью qRT-PCR мы оценили уровень экспрессии ряда генов, отвечающих за синтез антимикробных белков (галлериомицин, галиомицин, гловерин, цекропин-Д, 6-Тох), в жировом теле и эпителиальной ткани кишечника насекомых на третьи сутки после инфицирования БТ. Заражение насекомых приводило к увеличению синтеза практически всех изучаемых АМБ в жировом теле и кишечнике инфицированных насекомых по сравнению с контролем (в 5-20 раз). Следует отметить, что синтез АМБ у насекомых в ответ на инфекцию в основном изучают в жировом теле (Wojda et al., 2009; Mak et al., 2010). В тоже время, «локальный» синтез АМБ в кишечнике, т.е. непосредственно в месте проникновения и развития патогена, может играть важную роль на первых этапах воздействия бактерий и их метаболитов на организм насекомых (Vogel et al., 2011; Xu et al., 2012). Установлено, что заражение насекомых бактериями вызывало достоверно ( $p \leq 0.05$ ) более высокий уровень экспрессии генов таких антимикробных белков, как галлериомицин и галиомицин в кишечнике инфицированных насекомых по сравнению с уровнем синтеза в жировом теле.



**Рисунок 2.** Экспрессия антимикробных белков, ингибитора металлопротеаз (IMPI), шаперонов, регуляторов окислительно-восстановительного (ОВ) баланса и процессов регенерации в кишечнике и жировом теле у селектированной (устойчивые к БТ) и контрольной линий (восприимчивые к *V. thuringiensis* (БТ)) нативных и зараженных БТ (ЛК<sub>50</sub>) личинок воштинной огневки на второй день инфекции (\*  $p \leq 0.05$  по сравнению с остальными вариантами, #  $p \leq 0.05$ , ##  $p \leq 0.01$  для группы генов по сравнению с заражением БТ,  $n=3$  на вариант для каждого гена).

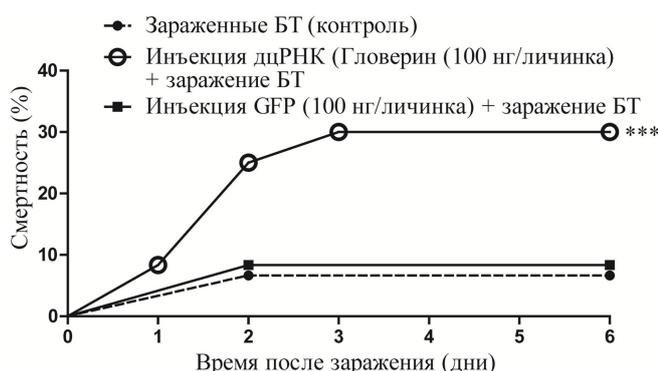


**Рисунок 3.** Общее число гемоцитов (А), гемоциты с фагоцитарной (Б) и фенолоксидазной (ФО) (В) активностью; активность инкапсуляции (Г), ФО (Д), коагуляции (Е) и лизоцима (Ж) в гемолимфе личинок *G. mellonella*, зараженных сублетальной (ЛК<sub>15</sub>) и полублетальной (ЛК<sub>50</sub>) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ) (\*  $p \leq 0.05$  по сравнению с незараженными насекомыми (контроль), ++  $p \leq 0.05$  по сравнению с ЛК<sub>50</sub>,  $n=60-120$  на вариант на каждую временную точку).

### Подавление экспрессии гловерина у личинок воициной огневки при заражении БТ

Для более детального анализа вклада АМБ в защиту против бактериальной инфекции, мы провели эксперимент с подавлением экспрессии (сайленсингом) гловерина. Было установлено, что подавление экспрессии гловерина приводит к достоверному увеличению смертности насекомых при бактериальной инфекции, вызванной БТ (Рисунок 4). Известно, что гловерин обладает активностью против бактерий, в том числе против БТ (Hwang, Kim, 2011).

Полученные нами данные, подчеркивают защитную роль данного АМБ при бактериозе.



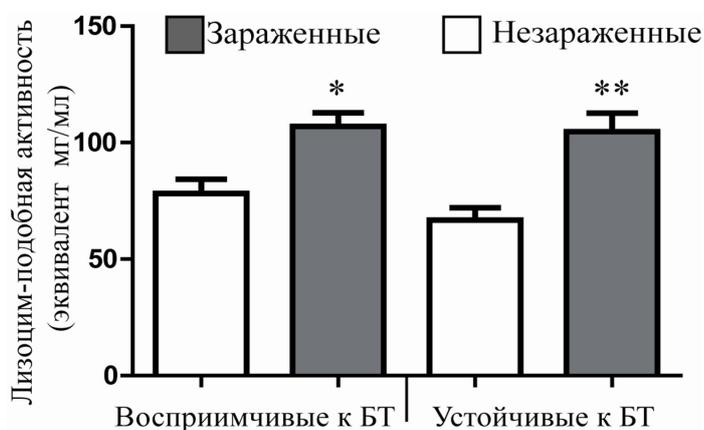
**Рисунок 4.** Смертность личинок вошинной огневки при заражении *B. thuringiensis* (БТ) после инъекции физиологического раствора (физраствор), интерферирующей дцРНК-Гловерин и дцРНК-GFP (как дополнительный контроль) (\*\*\*)  $p \leq 0.001$  по сравнению с инъекцией физраствора и дцРНК-GFP,  $n=150$  для каждого варианта).

### 3.5.2. Показатели иммунитета у линий вошинной огневки с различной чувствительностью к *B. thuringiensis*

При сравнении активности фенолоксидаз плазмы не было показано достоверных отличий у личинок *G. mellonella* селектированной линии по сравнению с насекомыми контрольной линии. Было установлено достоверное ( $p \leq 0.05$ ) снижение активности процесса инкапсуляции у личинок *G. mellonella* селектированной линии по сравнению с насекомыми контрольной линии. Отсутствие адаптации, в виде повышенного базового уровня реакции инкапсуляции и активности ФО у устойчивых насекомых, может свидетельствовать о вторичной роли данных защитных систем в формировании резистентности вошинной огневки к БТ в ходе микроэволюции. В связи с этим, в дальнейших исследованиях иммунитета у устойчивых насекомых, внимание было сосредоточено на локальных иммунных реакциях в кишечнике, как месте проникновения инфекции.

#### Лизоцим-подобная активность в кишечнике

Лизоцим-подобная активность в кишечнике как восприимчивой, так и устойчивой линий достоверно увеличивалась в 1.5 раза при заражении ( $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$ ) (Рисунок 5).



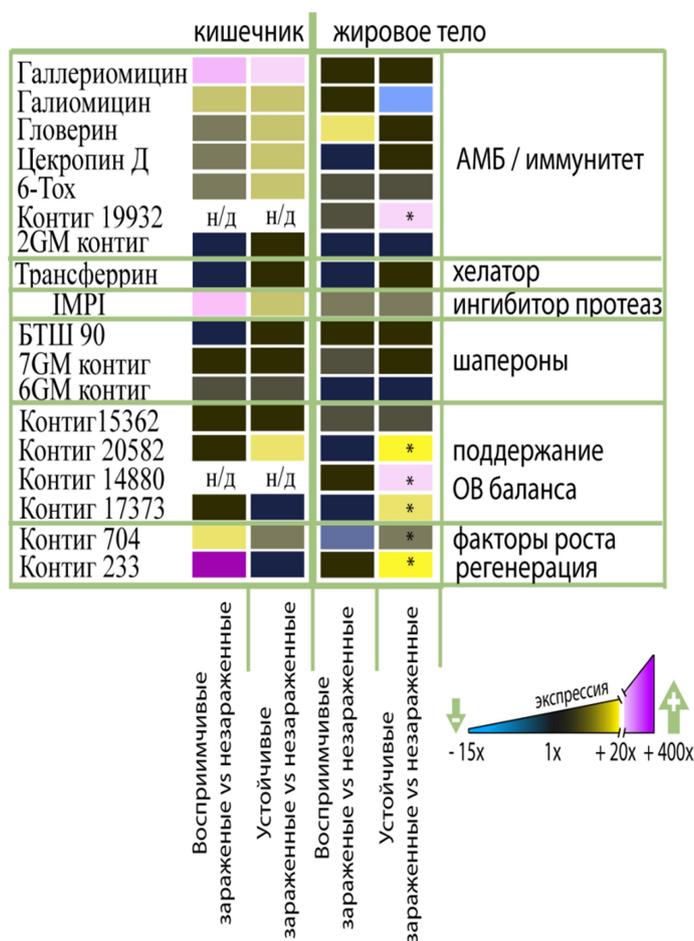
**Рисунок 5.** Лизоцим-подобная активность в кишечнике личинок селектированной (устойчивые к *B. thuringiensis* (БТ)) и контрольной (восприимчивые к БТ) линий (восприимчивые к БТ) на второй день после заражения БТ (ЛК<sub>50</sub>) (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  по сравнению с незараженными насекомыми,  $n=100$  для каждого варианта)

## Уровень экспрессии генов иммунного ответа у насекомых, селектированных на устойчивость к БТ

Установлено, что базовый уровень экспрессии АМБ (в вариантах без заражения) у устойчивой линии был выше, чем у восприимчивой: в кишечнике в  $1.44 \pm 0.27$  раза, в жировом теле в  $4.46 \pm 1.30$  раз (Рисунок 2). При этом увеличение экспрессии общего пула АМБ была выше в жировом теле ( $3.15 \pm 0.53$ ) по сравнению с кишечником ( $1.41 \pm 0.23$ ) ( $p \leq 0.05$ ).

При заражении устойчивой и восприимчивой линий насекомых данная тенденция сохранялась. У устойчивых насекомых уровень экспрессии АМБ генов оставался выше по сравнению с восприимчивыми и в кишечнике (в 1.5-2 раза), и в жировом теле (в 5-10 раз) (Рисунок 2). Следует отметить, что при заражении насекомых обеих линий бактериями БТ происходило увеличение экспрессии АМБ, а также были установлены тканеспецифические различия в уровне экспрессии (Рисунок 6). В частности, экспрессия галлериомицина была в 45 раз выше, а галлериомицина, гловерина и 6-Тох в 6-7 раз выше в кишечнике устойчивой и восприимчивой линий при заражении БТ по сравнению с жировым телом (Рисунок 6).

Таким образом, полученные нами данные и ряд других исследований (Ericsson et al., 2009; Yang et al., 2011; Eleftherianos, Revenis, 2011) подтверждают нашу гипотезу о том, что насекомые устойчивой линии могут противостоять бактериальной инфекции БТ за счет повышенного базового уровня и дополнительной экспрессии АМБ генов в кишечнике.

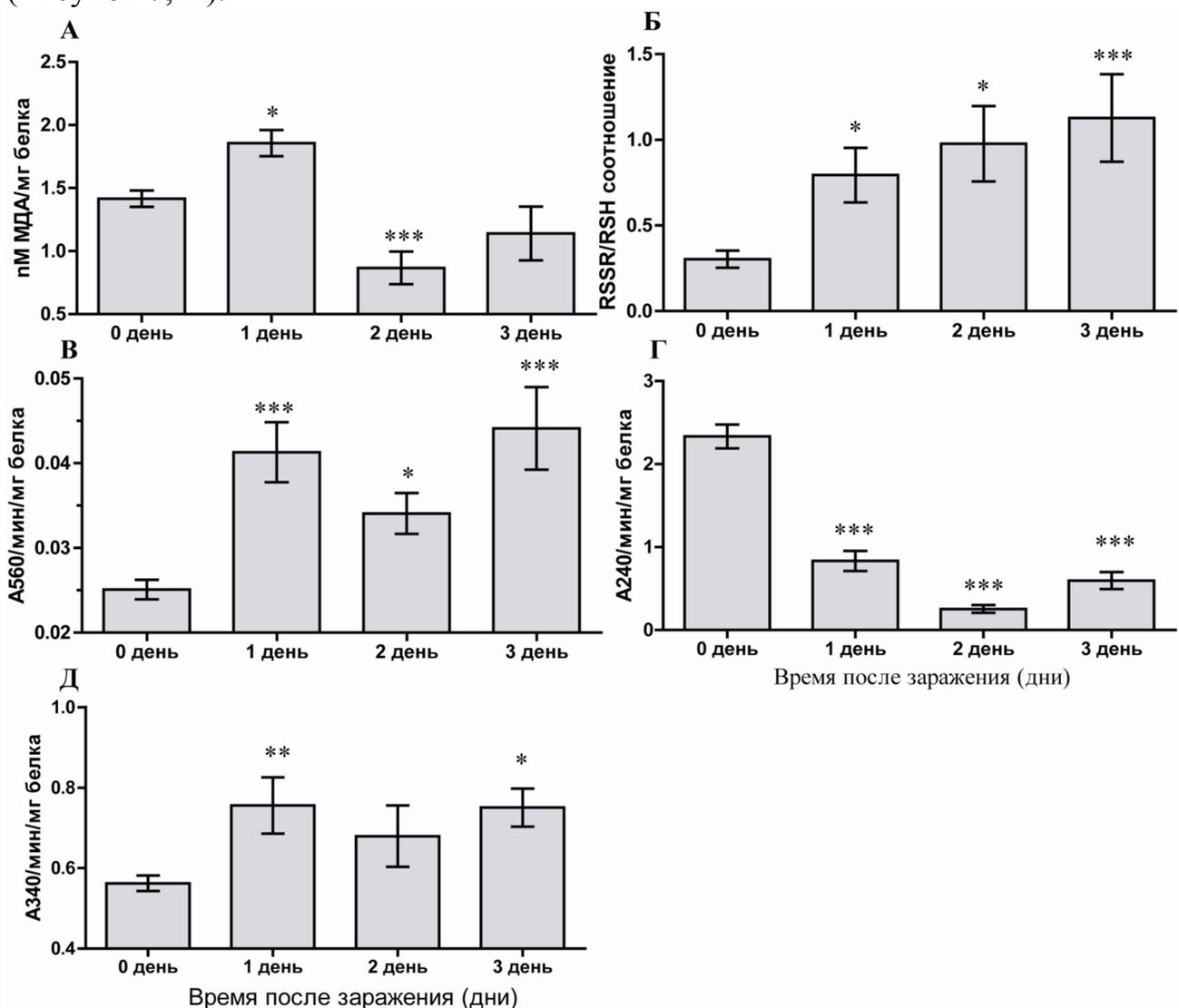


**Рисунок 6.** Экспрессия антимикробных белков, ингибитора металлопротеаз, шаперонов, регуляторов окислительно-восстановительного баланса и процессов регенерации в кишечнике и жировом теле личинок воцинной огневки *G. mellonella* контрольной линии (восприимчивые к *B. thuringiensis* (БТ)) и селектированной на устойчивость к бактериям линии (устойчивые к БТ) на фоне заражения полулетальной (ЛК<sub>50</sub>) концентрацией бактерий БТ (вторые сутки после заражения). Данные представлены как кратность изменений в экспрессии генов у зараженных насекомых по сравнению с конституциональной (без заражения) экспрессией, n=3 на вариант для каждого гена.

### 3.6. Окислительно-восстановительный баланс у насекомых при бактериозе *B. thuringiensis*

#### 3.6.1. Роль антиоксидантной системы в кишечнике при бактериозе БТ

Связывание токсина БТ с рецепторами на поверхности цитоплазматической мембраны эпителиальных клеток приводит к образованию пор и нарушению свойств клеточной мембраны. Это может усиливать процессы перекисного окисления липидов и, как следствие, вызывать образование большого количества АКМ. Малоновый диальдегид (МДА) является одним из индикаторов активности перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Зенков и др., 2001). На первый день после заражения насекомых БТ мы зафиксировали достоверное ( $p \leq 0.05$ ) увеличение концентрации МДА в кишечнике личинок вощинной огневки по сравнению с незараженными насекомыми (Рисунок 7, А). Однако на второй день после заражения концентрация МДА в кишечнике насекомых снижалась ( $p \leq 0.001$ ) (Рисунок 7, А). На третий день концентрация МДА у зараженных насекомых не отличалась от контрольных (незараженных) (Рисунок 7, А).



**Рисунок 7.** Концентрация малонового диальдегида (А), соотношение окисленных тиолов к восстановленным (RSSR/RSH) (Б), активность супероксиддисмутазы (СОД) (В), каталазы (Г), и глутатион-S-трансферазы

(ГСТ) (Д) в среднем отделе кишечника личинок вощинной огневки при заражении бактериями БТ ( $LK_{50}$ ), (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  по сравнению с незараженными насекомыми (0 день),  $n=60$  для каждого варианта).

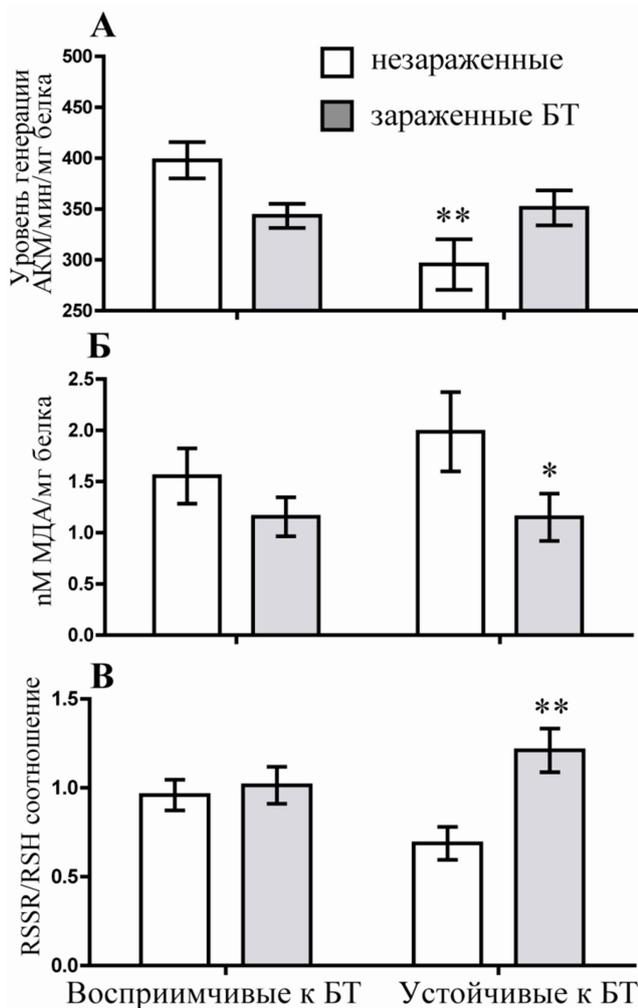
Для изучения вклада антиоксидантной системы в защитные реакции при бактериозе мы провели оценку активности ряда ферментативных и не ферментативных антиоксидантов. В частности, мы установили, что происходит достоверное ( $p \leq 0.05$ ) увеличение соотношения окисленных тиолов к восстановленным  $RSSR/RSN$  в кишечнике зараженных БТ насекомых по сравнению с незараженными на первый, второй и третий дни эксперимента (Рисунок 7, Б). При анализе активности ферментативных антиоксидантов в ходе бактериальной инфекции, было установлено увеличение активности супероксиддисмутазы (СОД) в течение всего эксперимента ( $p \leq 0.05$ ;  $p \leq 0.001$ ) (Рисунок 7, В). Активность глутатион-S-трансферазы (ГСТ) в кишечнике зараженных насекомых была достоверно выше на первый ( $p \leq 0.05$ ) и третий ( $p \leq 0.001$ ) дни после заражения по сравнению с контролем (рисунок 7, Д). В то же время, активность каталазы была ниже у зараженных насекомых по сравнению с контролем ( $p \leq 0.001$ ) (Рисунок 7, Г).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что БТ вызывает у насекомого окислительный стресс (повышение концентрации МДА, окисление тиолов), в ответ на который происходит повышение активности СОД и ГСТ, что ведет к снижению уровня АКМ. Увеличение активности ГСТ на первые сутки после заражения происходило вместе с повышением концентрации МДА. Можно предположить, что ГСТ принимает участие в детоксикации токсичных продуктов ПОЛ и, в частности, может инактивировать органические гидропероксиды, защищая таким образом клетки от продуктов ПОЛ (Morrissey, Brien, 1980).

### **3.6.2. Окислительно-восстановительный баланс в кишечнике и жировом теле насекомых с различной чувствительностью к *B. thuringiensis***

У личинок вощинной огневки с повышенной устойчивостью к БТ и личинок контрольной линии, восприимчивых к БТ, был проведен анализ генерации АКМ в кишечнике при заражении бактериями. В частности, было установлено, что у личинок устойчивой линии уровень генерации АКМ в кишечнике достоверно в 1.3 раза ниже ( $p \leq 0.01$ ), чем у личинок контрольной линии (Рисунок 8, А).

Заражение бактериями БТ не приводило к достоверным изменениям уровня генерации АКМ у обеих линий. Концентрация МДА в кишечниках была на одном уровне у нативных личинок обеих линий. Однако при заражении происходило достоверное двукратное ( $p \leq 0.05$ ) снижение концентрации МДА у личинок устойчивой линии (Рисунок 8, Б). Соотношение окисленных тиолов к восстановленным было на одном уровне в кишечниках устойчивой и восприимчивой линий. В то же время, при заражении зарегистрировано резкое увеличение соотношения тиолов у устойчивых насекомых ( $p \leq 0.01$ ) (Рисунок 8, В).



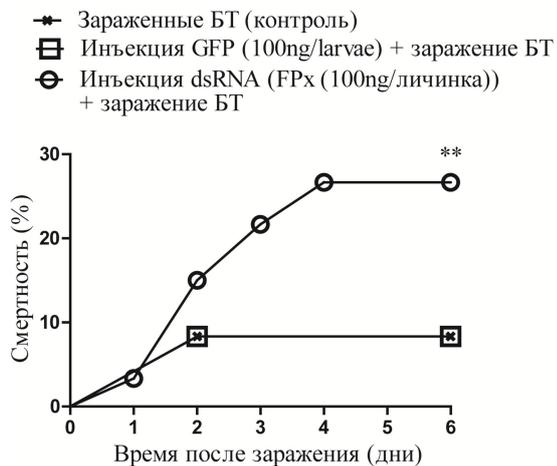
**Рисунок 8.** Уровень генерации активированных кислородных метаболитов (АКМ) (А), концентрация малонового диальдегида (МДА) (Б), соотношение окисленных тиолов к восстановленным (RSSR/RSH) (В) в среднем отделе кишечника личинок вошинной огневки селектированной (устойчивые к *B. thuringiensis* (БТ)) и контрольной линий (восприимчивые к БТ) на первые сутки после заражения БТ (ЛК<sub>50</sub>), (\*  $p \leq 0.05$  по сравнению с незараженными БТ насекомыми той же линии, \*\*  $p \leq 0.01$  по сравнению с восприимчивыми насекомыми, незараженными БТ,  $n=60-90$  для каждого варианта).

Уровень экспрессии регуляторов окислительно-восстановительного баланса в жировом теле и кишечнике насекомых, устойчивых к БТ

В качестве исследуемых фрагментов ДНК мы использовали: контиг 20582, контиг 14880, 6GM контиг 5976 и контиг 15362, связанные с регуляцией ОВ баланса, апоптоза и сигнальной трансдукцией, контиг 17373, который описан как кодирующий глутатион пероксидазу, а также трансферрин (Vogel et al., 2011). Трансферрин является хелатором железа, что может снижать уровень АКМ из-за снижения активности реакции Фентона (Nappi et al., 2000; Зенков и др., 2001). Также следует отметить, что снижение концентрации железа в среде может затруднять развитие энтомопатогенных бактерий рода *Bacillus* (Segond et al., 2014).

Конституциональный уровень экспрессии данных генов у насекомых устойчивой линии был выше в жировом теле  $3.93 \pm 1.07$  и кишечнике  $4.97 \pm 2.64$  (Рисунок 2) по сравнению с восприимчивой линией. При заражении бактериями БТ было отмечено достоверное увеличение экспрессии контигов АО системы (контиг 17373, контиг 20582) и регуляторов апоптоза (контиг 14880) в жировом теле насекомых устойчивой линии (Рисунок 6). В целом, заражение вызывало достоверное ( $p \leq 0.01$ ) увеличение ( $41.12 \pm 16.35$ ) всей группы генов АО системы у устойчивых насекомых по сравнению с восприимчивыми (Рисунок 2).

Кроме того, мы установили, что подавление экспрессии глутатион пероксидазы (FPx) приводит к достоверному ( $p \leq 0.01$ ) увеличению смертности насекомых при бактериальной инфекции БТ (Рисунок 9).



**Рисунок 9.** Смертность личинок воштинной огневки на фоне заражения БТ при инъекции физраствора (контроль), интерферирующей дцРНК-FPx и дцРНК-GFP (как дополнительного контроля) (\*\*  $p \leq 0.01$  по сравнению с инъекцией физраствора и дцРНК-GFP,  $n=150$  для каждого варианта).

Пониженная генерация АКМ в кишечнике устойчивых насекомых, а также снижение концентрации МДА на фоне увеличения окисления тиолов и активации ферментативных антиоксидантов при заражении БТ, может свидетельствовать об адаптации устойчивых насекомых к преодолению инфекции за счет контроля АКМ, как одного из патологических факторов бактериоза.

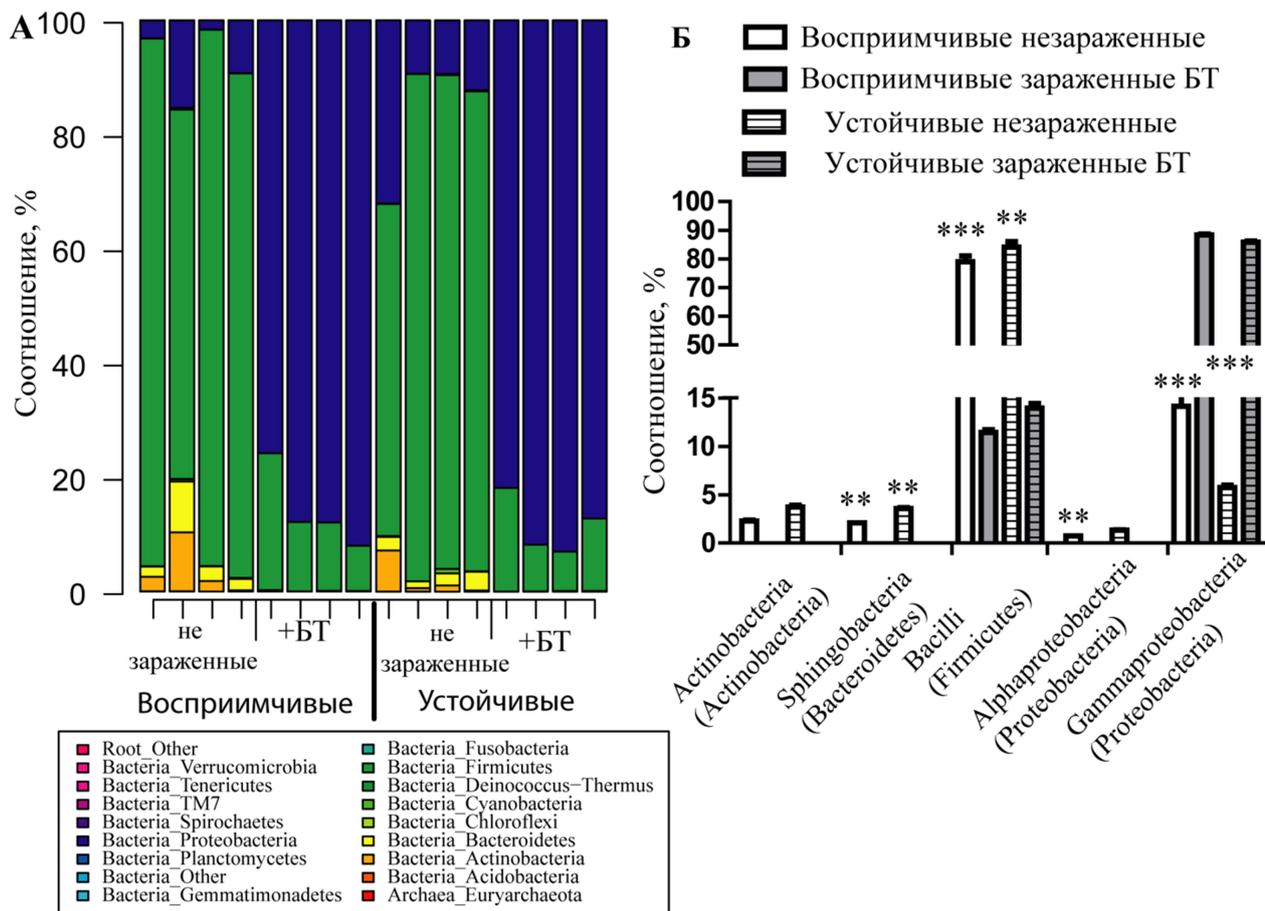
### 3.6.3. Уровень экспрессии белков теплового шока при бактериозе

Участие белков теплового шока (БТШ) в бактериальном патогенезе было оценено по уровню экспрессии БТШ 90 (HSP90) и контига 7GM 21310, который отвечает за продукцию белка, участвующего в активации БТШ 70. Конституциональный уровень экспрессии генов БТШ у насекомых устойчивой линии был выше в жировом теле  $2.73 \pm 0.63$  и понижен в кишечнике по сравнению с восприимчивой линией. При заражении бактериями БТ уровень экспрессии генов БТШ повышался (1.5 - 2 раза) в жировом теле, но понижался (в 2 раза) в кишечнике обеих линий.

Можно предположить, что БТШ принимают участие в защите организма насекомого при бактериальной инфекции. Не исключено, что их активность связана с характерным для данной группы белков ответом на любой стресс, которому подвергается организм (Wojda et al, 2007; 2013). Возможно, БТШ выступают дополнительным фактором, стабилизирующим работу клеток на фоне токсикоза, вызванного бактериальными метаболитами.

### 3.7. Состав микрофлоры кишечника насекомых при бактериозе вызываемом *B. thuringiensis*

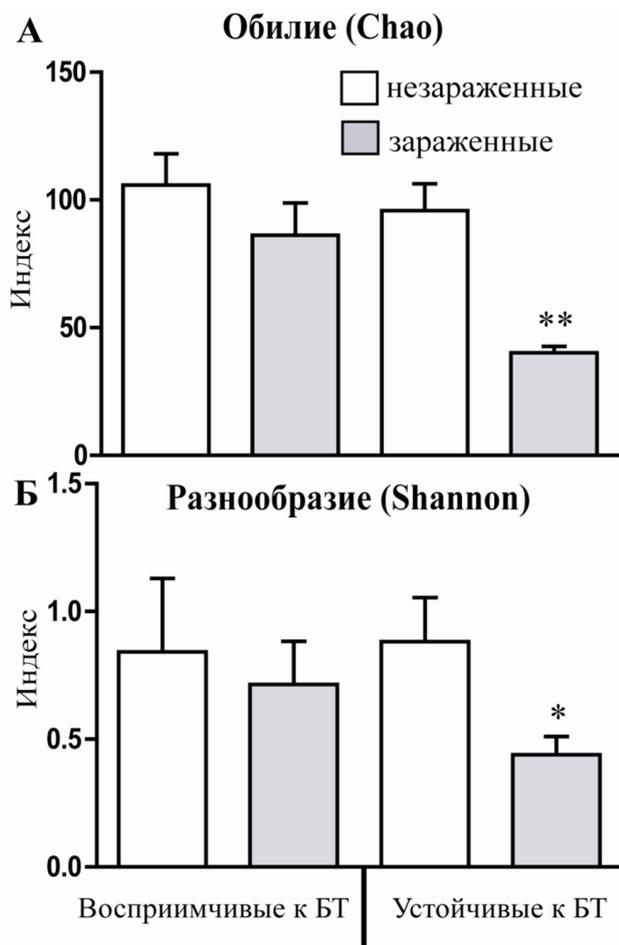
В кишечнике личинок восприимчивой и устойчивой к БТ линий доминировали бактерии нескольких типов. В частности, 99.5% сообщества было представлено четырьмя типами: Firmicutes ( $80.7 \pm 6.3\%$ ), Proteobacteria ( $11.8 \pm 4.5\%$ ), Actinobacteria ( $3.9 \pm 1.6$ ) и Bacteroidetes ( $3.1 \pm 1.1$ ) (Рисунок 10, А). Достоверных отличий в соотношении бактерий на уровне типов и классов между линиями не было. Однако у нативных личинок устойчивой линии было в 2 раза больше бактерий рода *Enterobacter* в сравнении с восприимчивой ( $p \leq 0.05$ )



**Рисунок 10.** Состав бактериального сообщества в кишечнике личинок селектированной (устойчивые к БТ) и контрольной (восприимчивые к БТ) линий на вторые сутки после заражения бактериями БТ. (А) Бактерии классифицированы до типа (каждый вариант представлен в четырех повторностях). (Б) Бактерии, классифицированные до типа и класса (повторности каждой колонки сгруппированы соответственно варианту) (\*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  по сравнению с зараженными,  $n=4$  для каждого варианта).

Инфицирование личинок обеих линий бактериями БТ приводило к значительному сдвигу в составе микрофлоры от *Firmicutes* ( $80.7 \pm 6.3\%$ ) к *Proteobacteria* ( $86.3 \pm 2.6\%$ ) ( $p \leq 0.001$ ) (Рисунок 10, Б). Отличий между линиями на уровне типов и классов не было. Тем не менее, у зараженных личинок устойчивой линии было отмечено меньше бактерий рода *Pseudomonas*, чем у восприимчивой (0.5% и 8% соответственно) ( $p \leq 0.05$ ).

В кишечниках насекомых устойчивой линии происходило достоверное снижение биоразнообразия бактерий при заражении БТ, а именно снижалось число филотипов бактерий (индекс Чао) (Рисунок 11, А) и их распределение (индекс Shannon) (Рисунок 11, Б).



**Рисунок 11.** Обилие (А) и разнообразие (Б) бактериального сообщества у личинок вошинной огневки селектированной (устойчивые к БТ) и контрольной линий (восприимчивые к БТ) на вторые сутки после заражения БТ (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  по сравнению с остальными вариантами;  $n=4$  для каждого варианта).

Нарушение целостности кишечника токсинами БТ создает возможность микробиоте проникнуть в гемоцель, после чего происходит септицемия и насекомое погибает. Полученные нами результаты свидетельствуют, что повреждения кишечника запускают ряд сигнальных путей активации иммунной системы. Вероятно, гемоциты, реализующие реакции клеточного и гуморального

иммунитета, могут предотвращать незначительные проникновения микроорганизмов при бактериозе. Более того, данные, полученные нами на устойчивой линии, свидетельствуют о том, что одной из адаптаций насекомых в ходе формирования устойчивости к БТ является повышение базового уровня экспрессии антимикробных белков (АМБ) в жировом теле и, особенно, в кишечнике. При заражении и последующей активации АМБ уровень экспрессии у устойчивых насекомых остается более высоким, чем у восприимчивых. Следует отметить, что действие АМБ может быть направлено как на вегетативные клетки БТ, так и на бактерий кишечной микрофлоры, которые также могут представлять опасность для насекомого при патогенезе БТ (Raymond et al., 2009; Nielsen-LeRoux et al., 2012). Кроме того, АМБ могут способствовать активации всего комплекса защитных реакций насекомого за счет более раннего разрушения клеток БТ, высвобождающиеся компоненты которых могут выполнять иммуномодулирующие функции. Таким образом, вероятно, одним из направлений эволюции резистентности к БТ является формирование адаптаций, связанных с увеличением как конституционального, так и индуцибельного уровней АМБ в кишечнике и жировом теле.

## ГЛАВА 4. Внутривидовая микроэволюционная стратегия устойчивости вощинной огневки против энтомопатогенных грибов *B. bassiana*

### 4.1. Восприимчивость меланистической и ахромистической морф вощинной огневки к грибам *B. bassiana*

При топикальном (перкутанном) заражении личинок меланистической и ахромистической морф была зафиксирована повышенная устойчивость меланистов к грибу *B. bassiana* по сравнению с ахромистами (для  $5 \times 10^5$  / мл,  $p \leq 0.01$ ; для  $5 \times 10^6$  / мл,  $p \leq 0.0001$ ; для  $5 \times 10^7$  / мл,  $p \leq 0.001$ ). Коэффициент резистентности, (RR) – частное при делении ЛК<sub>50</sub> меланистов на ЛК<sub>50</sub> ахромистов, составлял 12.91.

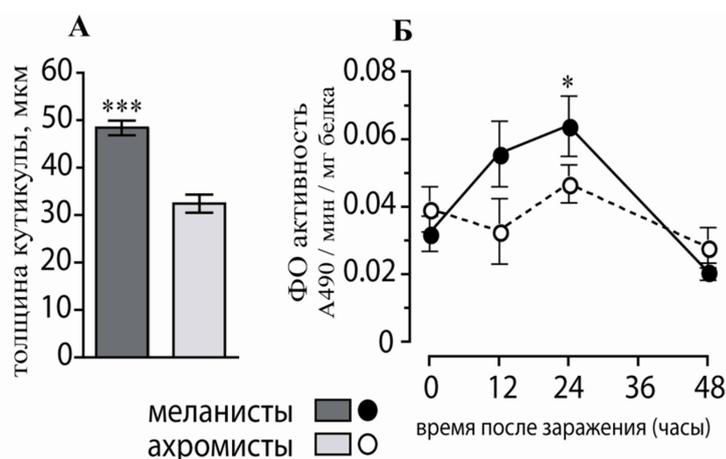
### 4.2. Кутикулярные защитные механизмы меланистической и ахромистической морф

#### *Адгезия и прорастание конидий гриба*

Первый этап микоза начинается с адгезии конидий и вполне закономерно, что их количество и способность закрепляться будет определять интенсивность микоза. Поверхностные жирные кислоты и воска могут ингибировать рост уже адгезировавшихся конидий. При анализе адгезии конидий мы не обнаружили достоверных отличий между меланистами и ахромистами. При изучении влияния состава эпикутикулярных экстрактов мы также не обнаружили отличий между морфами. Активация конидий на кутикуле личинок не отличалась между морфами и активно происходила в первые 24 часа после заражения. Однако через 48 часов после заражения проникновение гриба в гемоцель было достоверно выше у ахромистов. В частности, активность прорастания конидий грибов в кутикулу ахромистов в 1.7 раза выше ( $p \leq 0.001$ ), а колонизация гемолимфы в 6 раз выше ( $p \leq 0.001$ ) по сравнению с меланистами.

#### *Механические и химические защитные свойства кутикулы*

Общеизвестно, что на скорость проникновения гриба в организм насекомого может влиять толщина кутикулы. Кутикула личинок меланистов была достоверно толще, чем у ахромистов ( $48.4 \pm 1.5$  мкм и  $32.4 \pm 1.9$  мкм соответственно) ( $p \leq 0.0001$ ) (Рисунок 12, А). Кроме того, в толще кутикулы находятся ферменты, в первую очередь, группа оксидаз (ФО и лакказа). В связи с этим, при проникновении гриба очень важен уровень «ответа» этих ферментов, определяемый их концентрацией и скоростью активации.



**Рисунок 12.** Толщина кутикулы (А) у личинок меланистической (меланисты) и светлой (ахромисты) морф вощинной огневки (\*\*\*)  $p \leq 0.0001$  по сравнению с ахромистами,  $n=30$  для каждого варианта). Активность ФО (Б) в покровах насекомых различных морф при развитии микоза, вызванного

*B. bassiana*. (\*  $p \leq 0.05$  по сравнению с ахромистами,  $n=30$  для каждого варианта и для каждой временной точки).

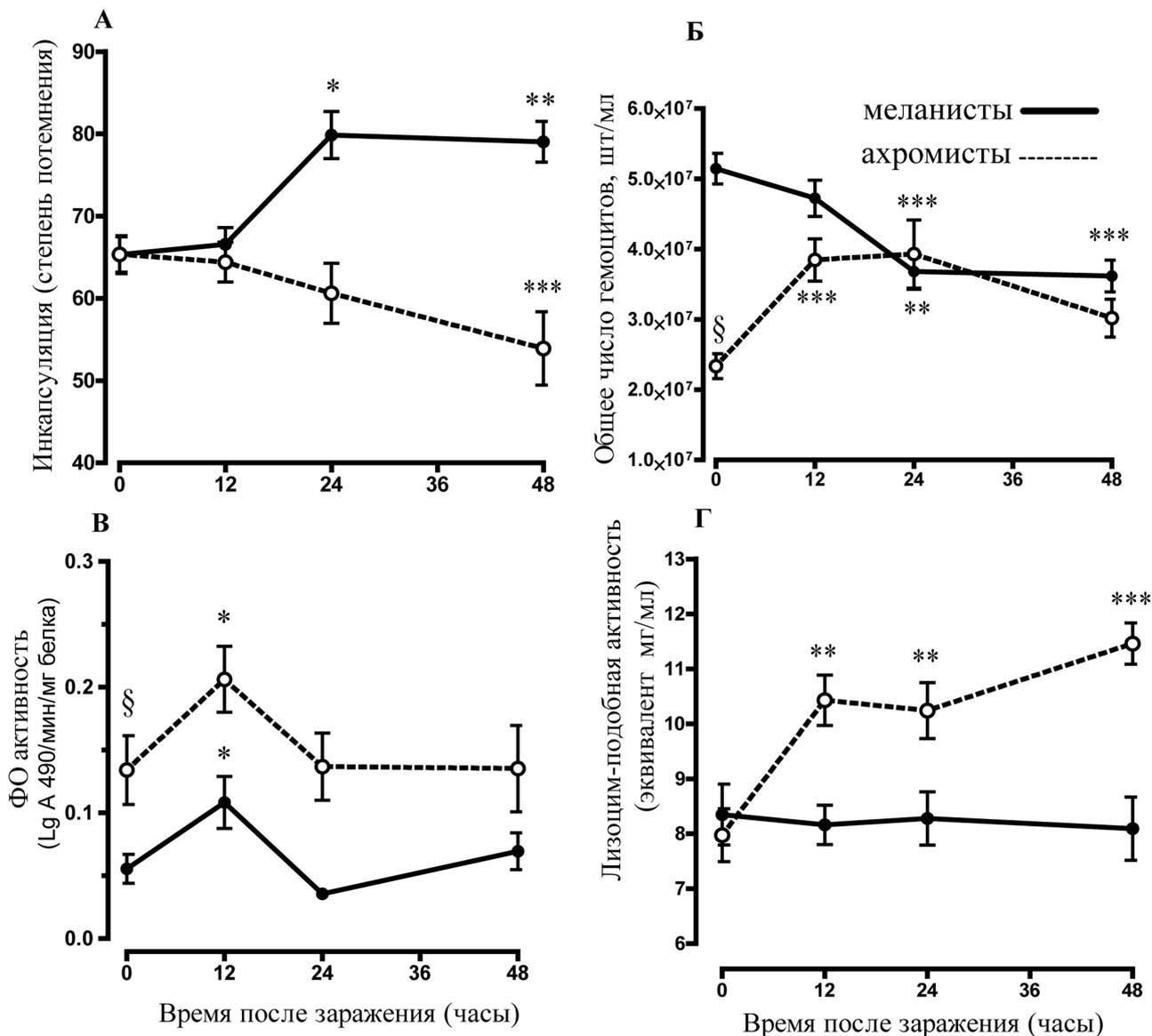
Конституциональный уровень ФО в покровах был одинаков у обеих морф (Рисунок 12, Б), хотя, на ранних этапах микоза (12-24 часа после заражения) ФО активность в покровах меланистов была выше, чем у ахромистов ( $p \leq 0.05$ ) (Рисунок 12, Б). К 48 часам активность ФО снижалась до контрольных значений у личинок обеих морф.

#### **4.3. Клеточный и гуморальный иммунный ответ личинок меланистической и ахромистической морфы**

Любое повреждение кутикулы, в том числе и гифами грибов, запускает иммунный ответ. При этом гемоциты могут скапливаться в районе повреждения, формируя клампы, дегранулироваться и запускать процесс инкапсуляции. Мы не обнаружили отличий в базовом уровне инкапсуляции между меланистической (меланисты) и светлой (ахромисты) морфами личинок воштинной огневки. Однако, через 24 и 48 часов после заражения грибом было отмечено резкое увеличение интенсивности инкапсуляции у меланистов ( $p \leq 0.01$  и  $p \leq 0.001$  соответственно) (Рисунок 13, А). При этом у ахромистов не только не отмечено повышения инкапсуляции, но даже происходило ее достоверное снижение по сравнению с незараженными особями на 2 сутки микоза ( $p \leq 0.001$ ) (рисунок 13, А). У личинок меланистов был отмечена большая концентрация гемоцитов в гемолимфе по сравнению с ахромистами ( $5.1 \times 10^7$  / мл и  $2.3 \times 10^7$  / мл соответственно) ( $p \leq 0.001$ ) (Рисунок 13, Б). Тем не менее, при заражении грибом концентрация гемоцитов у меланистов достоверно снижалась ( $p \leq 0.001$ ) (Рисунок 13, Б). У ахромистов, напротив, происходило увеличение концентрации гемоцитов на начальных этапах инфекции ( $p \leq 0.001$ ) (Рисунок 13, Б).

ФО активность в гемолимфе незараженных личинок ахромистов была достоверно выше, чем у меланистов ( $p \leq 0.05$ ) (Рисунок 13, В). У личинок обеих морф происходило резкое увеличение ФО активности через 12 часов после заражения грибом ( $p \leq 0.05$ ), затем активность фермента снижалась до уровня контроля (Рисунок 13, В). Лизоцим-подобная активность в гемолимфе нативных личинок обеих линий была одинаковой (Рисунок 13, Г). Интересно, что при заражении происходило увеличение лизоцим-подобной активности у ахромистов ( $p \leq 0.01$  на 12 ч,  $p \leq 0.01$  на 24 ч и  $p \leq 0.001$  на 48 ч), но не у меланистов (Рисунок 13, Г).

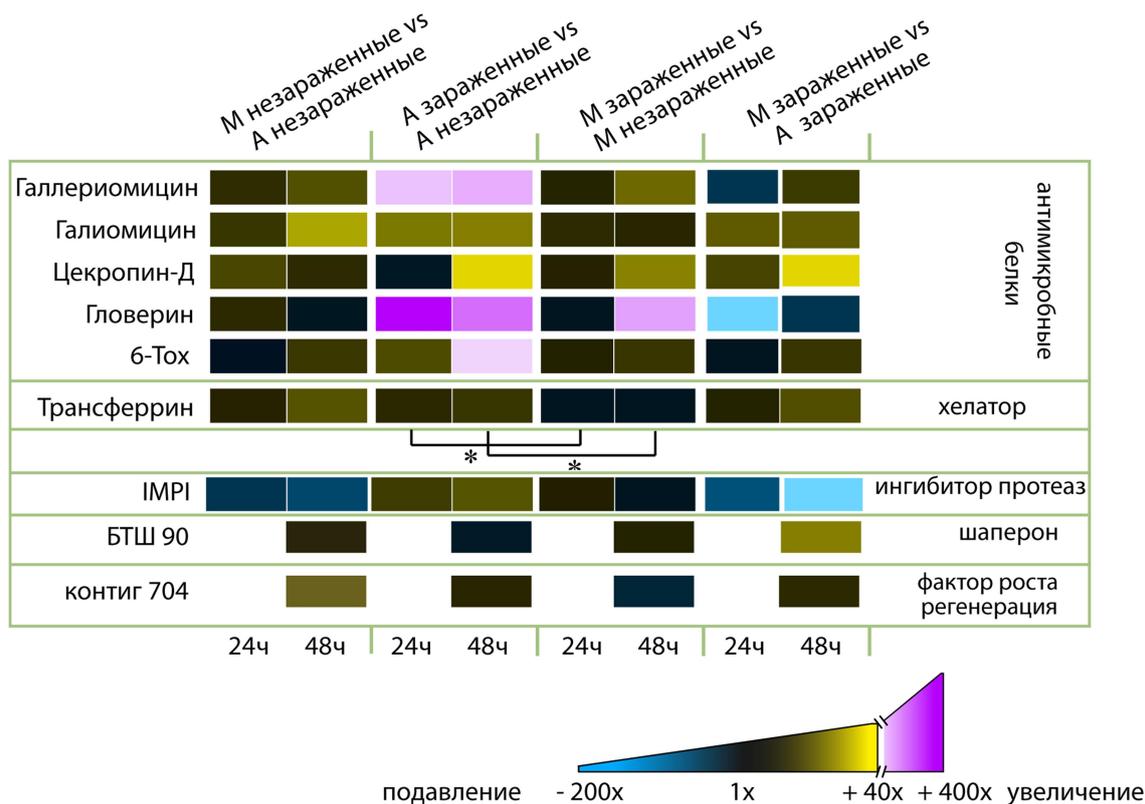
Анализ различий в конституциональной экспрессии отдельных генов в жировом теле у меланистов и ахромистов свидетельствует о том, что экспрессия *IMPI* была в 100 раз ниже у меланистов (Рисунок 14). Однако базовая экспрессия *AMB* генов была повышена в жировом теле личинок меланистов по сравнению с ахромистами в  $6.70 \pm 3.19$  раз на первый и в  $13.31 \pm 4.72$  раз на второй дни после заражения (Рисунок 14).



**Рисунок 13.** Интенсивность инкапсуляции (А), общее число гемоцитов (Б), ФО активность (В) и лизоцим-подобная активность (Г) в гемолимфе у личинок меланистической (меланисты) и светлой (ахромисты) морф вошинной огневки *G. mellonella* при заражении грибом *B. bassiana* (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  по сравнению с незараженными личинками (0 часов) той же морфы, §  $p \leq 0.05$  по сравнению с незараженными личинками меланистов,  $n=30-120$  для каждого варианта и временной точки).

При заражении насекомых грибом была отмечена более быстрая и выраженная активация АМБ генов у ахромистов по сравнению с меланистами (Рисунок 14). Экспрессия гловерина на первые сутки после заражения ахромистов увеличивалась в 363 раза, галлериомицина в 53 раза, галиомицина в 15 раз, 6-Тох в 8 раз. На вторые сутки экспрессия АМБ генов ахромистов оставалась повышенной по сравнению с незараженными насекомыми: для гловерина в 186 раз, для галлериомицина в 83 раза, для галиомицина в 16 раз, для 6-Тох в 22 раз, для цекропина-Д в 32 раза. У меланистов уровень экспрессии АМБ увеличивался в 5-15 раз для галлериомицина, галиомицина, 6-Тох, цекропина-Д и в 70 раз для гловерина на 2 сутки после заражения. Анализ

экспрессии группы АМБ генов при микозе у ахромистов показал их достоверное увеличение по сравнению с меланистами ( $p \leq 0.05$ ). (Рисунок 14).



**Рисунок 14.** Уровень экспрессии различных генов в жировом теле личинок меланистической (меланисты, М) и светлой (ахромисты, А) морф вощинной огневки *G. mellonella* на первые и вторые сутки после заражения грибом *B. bassiana* ( $p \leq 0.05$ ,  $n=3$  на вариант для каждого гена).

Данные представлены как кратность изменений ( $\Delta\Delta Ct$ ): у незараженных меланистов по сравнению с незараженными ахромистами (разница в конституциональном уровне экспрессии), у зараженных личинок обеих морф по сравнению с незараженными (кратность изменения в ответ на инфекцию), у зараженных личинок меланистов по сравнению с зараженными ахромистами (разница между морфами в кратности изменений в ответ на инфекцию). (\*  $p \leq 0.05$  разница для группы генов АМБ между морфами).

#### 4.4. Морфометрические и популяционные показатели насекомых меланистической и ахромистической морф

Насекомые меланистической морфы быстрее развивались до имаго, при этом они имели достоверно более низкий (на 30 %) вес куколок ( $p \leq 0.001$ ) по сравнению со светлой морфой. Как следствие, плодовитость меланистов была в 2 раза меньше по сравнению с ахромистами ( $284.5 \pm 28.5$  яиц и  $588.4 \pm 32.2$  яиц соответственно;  $p \leq 0.001$ ).

## **ГЛАВА 5. Формирование механизмов резистентности к микроорганизмам у личинок вощинной огневки *G. mellonella* при направленном отборе на устойчивость к *B. bassiana***

### **5.1. Селекция насекомых на устойчивость грибу *B. bassiana* и восприимчивость селектированной линии к энтомопатогенным грибам**

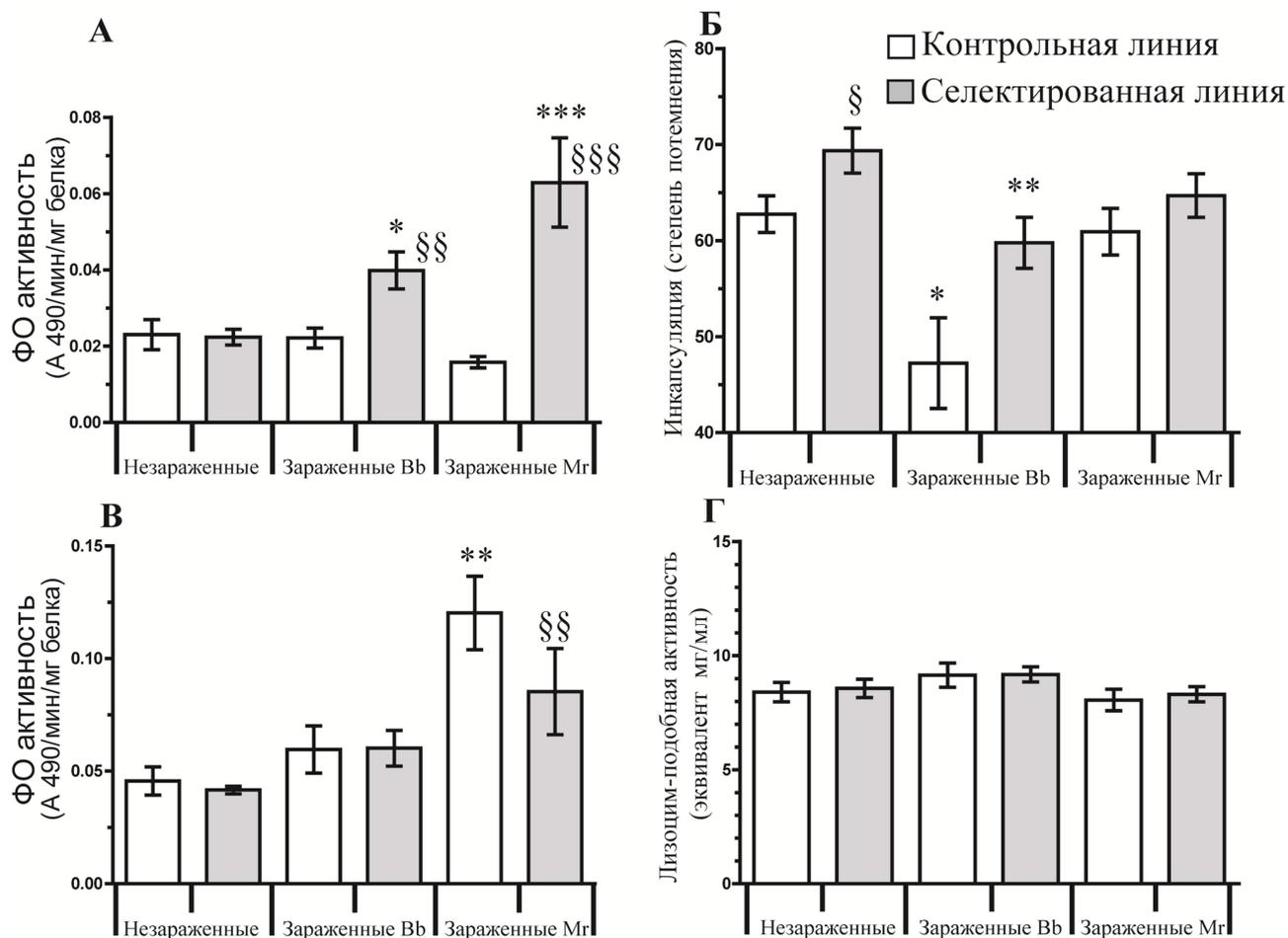
Мы провели направленный отбор личинок вощинной огневки по принципу устойчивости к грибу *B. bassiana*. Исходная популяция насекомых была разделена на две группы. Первую из них селектировали на устойчивость к грибу с помощью последовательного, в череде поколений, заражения полулетальной дозой конидий *B. bassiana* и получения потомства от выживших особей (селектированная линия), вторую оставляли без селекции (контрольная линия). При заражении насекомых селектированной (F25) и контрольной линий грибом *B. bassiana* было установлено достоверное ( $p \leq 0.01$ ) увеличение (на 10 %) устойчивости селектированных личинок по сравнению с контрольными. Следует отметить, что отбор на устойчивость к определенному виду гриба, в данном случае к *B. bassiana*, приводил к развитию специфической устойчивости, так как селектированная линия была восприимчива к другим таксонам грибов. Так, устойчивость к энтомопатогенному грибу *M. robertsii* у насекомых селектированной и контрольной линий была одинаковой.

### **5.2. Иммунный ответ у личинок линии вощинной огневки селектированной на устойчивость к грибу *B. bassiana***

Было установлено что, уровень адгезии и активации конидий грибов на поверхности кутикулы не отличался между личинками контрольной и селектированной линий. Аналогично, личинки селектированной и контрольной линий имели одинаковый конституциональный уровень ФО активности в покровах. Однако на ранних этапах заражения у личинок селектированной линии регистрировалось повышение активности ФО в покровах при заражении как *B. bassiana*, так и *M. robertsii*, по сравнению с личинками контрольной линии (рисунок 15, А).

У личинок селектированной линии зафиксирована повышенная базовая активность инкапсуляции в гемолимфе по сравнению с контрольными насекомыми ( $p \leq 0.05$ ) (Рисунок 15, Б). Однако интенсивность инкапсуляции достоверно снижалась у насекомых обеих линий при заражении грибом *B. bassiana* по сравнению с нативными особями (Рисунок 15, Б). При этом у личинок селектированной линии подавление инкапсуляции было достоверно меньше ( $p \leq 0.05$ ), чем у личинок контрольной линии (в 1.15 и 1.5 раз соответственно). Заражение насекомых грибом *M. robertsii* не приводило к достоверным изменениям в активности инкапсуляции на первые сутки (Рисунок 15, Б).

Лизоцим-подобная активность в гемолимфе не отличалась между личинками контрольной и селектированной линий и не изменялась при заражении (Рисунок 15, Г). ФО активность в плазме гемолимфы достоверно увеличивалась при заражении личинок контрольной линии грибом *M. robertsii*, но не *B. bassiana* (Рисунок 15, В). ФО активность у незараженных личинок обеих линий была одинаковой (Рисунок 15, В).



**Рисунок 15.** Активность инкапсуляции в гемолимфе (А), фенолоксидазы (ФО) в покровах (Б) и плазме гемолимфы (В), лизоцим-подобная активность в гемолимфе (Г) у личинок селектированной грибом *B. bassiana* и контрольной (неселектированной) линий воцинной огневки на первые сутки после заражения грибами *B. bassiana* (Bb) и *M. robertsii* (Mr) (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  по сравнению незараженными той же линии, <sup>§</sup>  $p \leq 0.05$ , <sup>§§</sup>  $p \leq 0.01$ , <sup>§§§</sup>  $p \leq 0.001$  по сравнению с контрольной линией того же варианта заражения,  $n=60-120$  для каждого варианта).

#### Уровень экспрессии IMP1

У насекомых селектированной и контрольной линий мы провели анализ экспрессии индуцибельного ингибитора металлопротеаз IMP1 в покровах и жировом теле. Установлено, что базовый уровень IMP1 понижен в 2-3 раза в покровах селектированных насекомых. Однако при заражении селектированных личинок грибом *B. bassiana* происходит достоверная ( $p \leq 0.05$ ) активация его экспрессии в 4-5 раз по сравнению с зараженными личинками контрольной линии. В жировом теле зараженных насекомых наблюдалась обратная картина. Статистически значимое пятикратное увеличение экспрессии IMP1 происходило у зараженных контрольных насекомых ( $p \leq 0.05$ ). У насекомых, зараженных грибом *M. robertsii*, уровень IMP1 практически не менялся.

### Уровень экспрессии АМБ, шаперонов, поддержание окислительно-восстановительного баланса и регенерации

Был проанализирован конституциональный уровень экспрессии различных генов защитных систем у личинок селектированной линии по сравнению с контрольными насекомыми. Установлено, что экспрессия большинства генов у личинок селектированной линии была пониженной в жировом теле (в 2-3 раза) ( $p \leq 0.01$ ). В покровных тканях уровень экспрессии генов различных защитных систем практически не отличался между линиями. Однако, экспрессия группы генов антиоксидантной системы (контиг 17373 – глутатион пероксидаза, контиг 03093 – пероксиредоксин), регенерации (контиг 704), галиомицина и регулятора апоптоза (контиг 15265) была выше в 2-3 раза в покровах, но не в жировом теле селектированных насекомых по сравнению с контрольными.

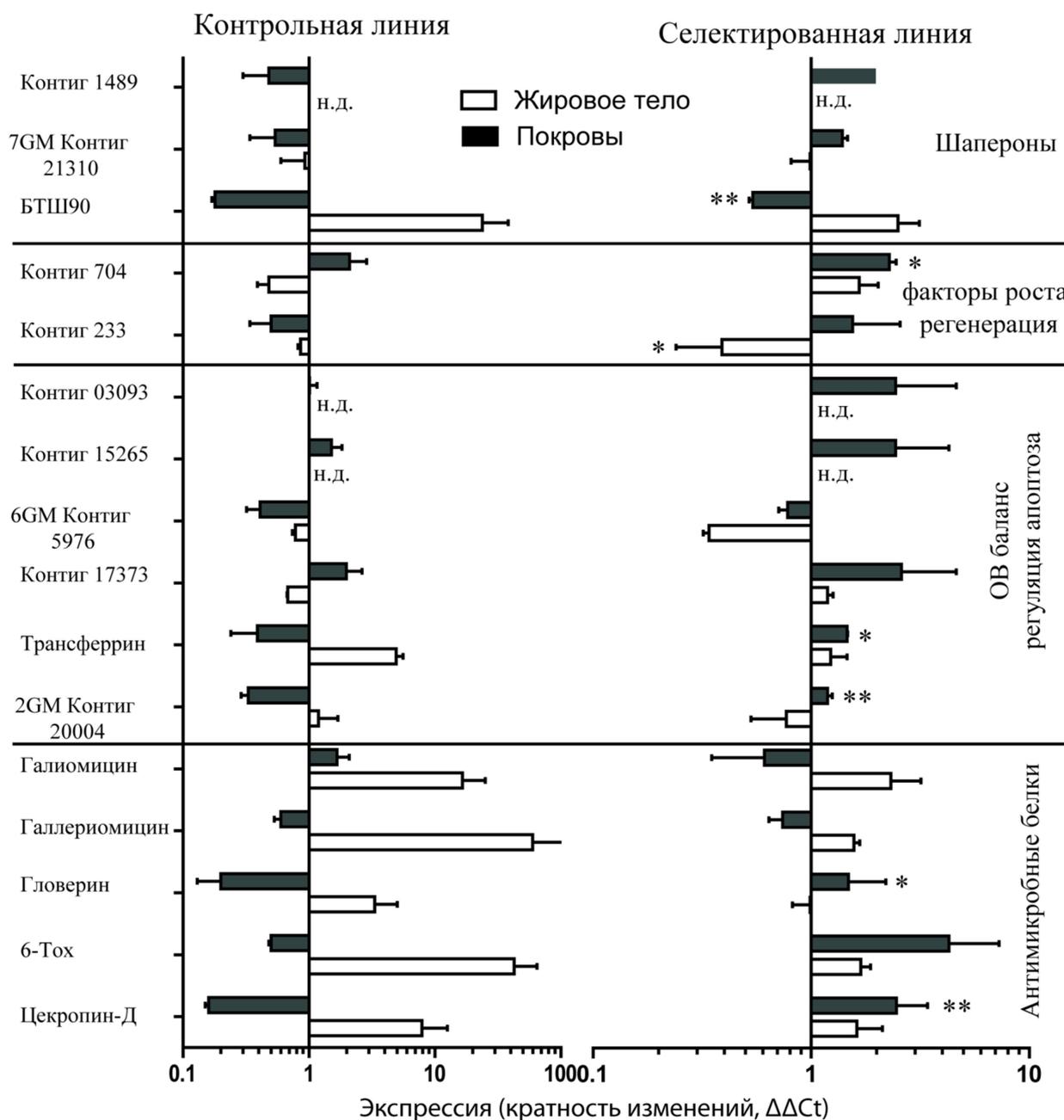
При заражении насекомых *B. bassiana*, активация ряда генов и их групп у селектированной линии была достоверно выше, чем у контрольной. В частности, мы обнаружили повышенный уровень экспрессии генов АМБ, генов, участвующих в поддержании ОВ баланса и процессах репарации в покровах селектированных насекомых. Активация цекропина-Д, гловерина и 6-Тох были достоверно выше, чем у контрольных насекомых (Рисунок 16). Экспрессия контигов, кодирующих антиоксидантные ферменты глутатионпероксидазу и пероксиредоксин, а также регуляторы апоптоза и трансферрин повышалась в покровах в 2-3 раза при заражении насекомых селектированной линии, но не контрольной ( $p \leq 0.05$ ) (Рисунок 16). В целом, активация группы генов АМБ была достоверно выше в покровах личинок селектированной линии при заражении *B. bassiana* по сравнению с контрольной ( $p \leq 0.05$ ). При анализе селекции всех генов селектированной и контрольной линий зараженных грибом отмечена интересная закономерность. У селектированной линии происходит активация экспрессии генов в покровах, но снижение в жировом теле в ответ на заражение по сравнению с контрольной линией (Рисунок 16).

При заражении насекомых селектированной и контрольной линий грибом *M. robertsii* происходила активация синтеза АМБ в жировом теле. Однако, активация была достоверно выше у насекомых контрольной линии ( $p \leq 0.05$ ). В покровных тканях активация генов АМБ происходила у личинок контрольной линии, но не селектированной ( $p \leq 0.05$ ). Экспрессия галиомицина, галлериомицина и 6-Тох была достоверно ниже у зараженных *M. robertsii* селектированных насекомых. Контиги, участвующие в регуляции ОВ баланса, и шапероны практически не активировались в жировом теле и покровах при микозе. Уровень БТШ 90 повышался в 5-10 раз в жировом теле обеих линий.

Анализируя разницу в экспрессии генов насекомых при микозах, вызванных разными грибами, можно отметить ряд особенностей. Иммунный ответ на заражение *B. bassiana* в эпидермальных клетках покровов у насекомых селектированной линии оказался более выраженным, чем на заражение *M. robertsii* ( $p \leq 0.05$ ). У насекомых контрольной линии развитие гриба *M. robertsii* индуцировало более интенсивную экспрессию генов как в

жировом теле, так и в покровах, чем при микозе, вызванном *B. bassiana* ( $p \leq 0.05$ ).

### При инфицировании *B. bassiana*



**Рисунок 16.** Уровень экспрессии различных генов в жировом теле и покровах личинок селектированной (25 поколений направленного отбора по принципу устойчивости к грибу *B. bassiana* (*Bb*)) и контрольной (неселектированной) линий вошинной огневки на первые сутки после заражения грибами *B. bassiana* (*Bb*). Представлен как кратность изменений ( $\Delta\Delta C_t$ ): у зараженных личинок обеих линий по сравнению с незараженными (\*  $p \leq 0.05$  разница по сравнению с экспрессией гена у личинок контрольной линии,  $n=3$  на вариант для каждого гена) н.д. - не детектировался.

### 5.3. Морфометрические и популяционные показатели линии вощинной огневки, устойчивой к грибу *B. bassiana*

Выживаемость у незараженных насекомых селектированной линии была такой же, как и у контрольной. При этом насекомые с повышенной устойчивостью к *B. bassiana* не отличались по весу куколок от насекомых контрольной линии. Однако время их развития было больше, чем у насекомых контрольной линии ( $p \leq 0.05$ ).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Энтомопатогенные кристаллообразующие бактерии *Bacillus thuringiensis* (БТ) и грибы *Beauveria bassiana* широко распространены в природе (Штейнхауз, 1952; Augustyniuk-Kram, Kram, 2012). Вполне очевидно, что насекомые постоянно контактируют с данными паразитами, что сопровождается определенным «давлением» патогена на популяции насекомых. В случае, когда вышеперечисленные микроорганизмы обладают низкой вирулентностью или уровень их инфекционной нагрузки незначителен, насекомые способны выжить, однако при определенных условиях могут развиваться локальные эпизоотии (Глулов и др., 2001; Nielsen-LeRoux et al., 2012; Крюков 2015). Таким образом, воздействие патогена может выступать фактором отбора, в результате чего происходит формирование иммунофизиологических адаптаций и развитие устойчивости насекомых.

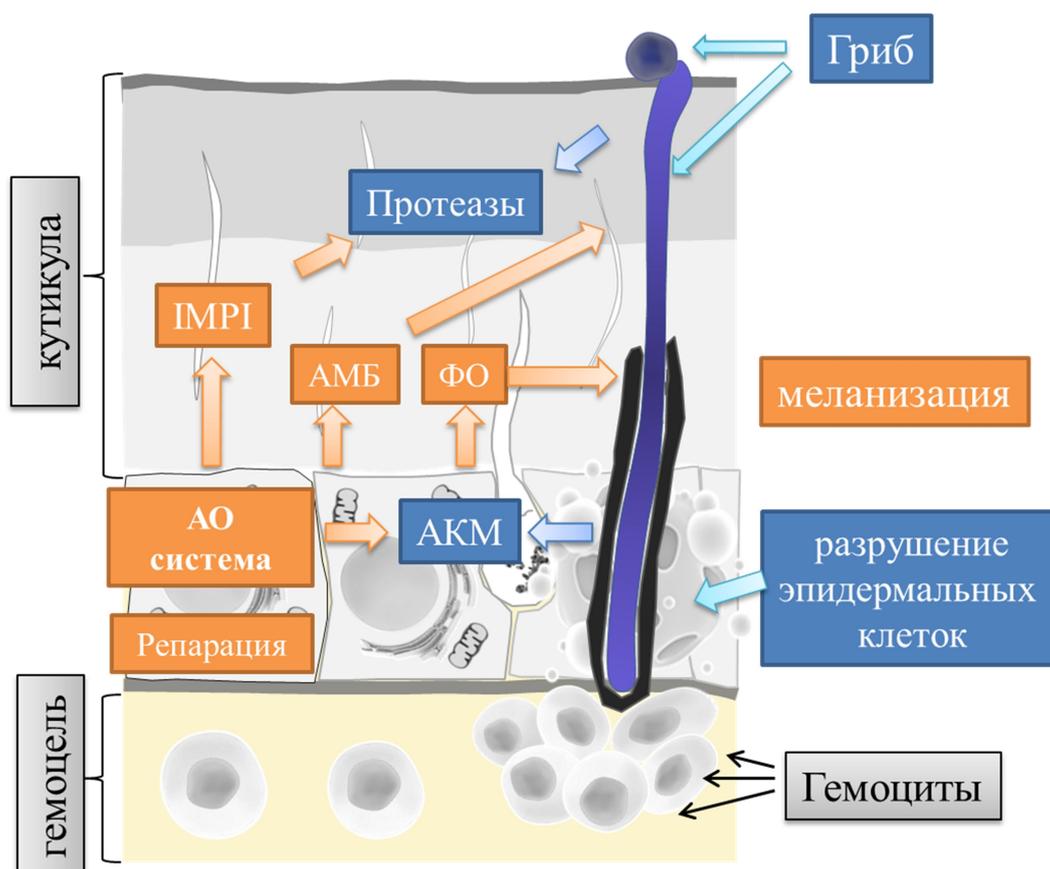
В данном исследовании проведен сравнительный анализ сформировавшихся в результате длительного эволюционного процесса меланистической и ахромистической морф личинок вощинной огневки *G. mellonella*, обладающих различными уровнями резистентности к энтомопатогенному грибу *B. bassiana*. Кроме того, в течение нескольких лет проведен направленный отбор личинок по принципу устойчивости к грибам *B. bassiana* и бактериям БТ. Полученные модели позволили проанализировать адаптационные процессы на различных эволюционных дистанциях: относительно коротких (десятки поколений) для селектированных линий и длинных (сотни поколений) для меланистических морф. У данных морф и линий вощинной огневки эволюция резистентности к БТ и *B. bassiana* сопровождается изменением целого комплекса морфофизиологических систем организма, приводящих к формированию устойчивости насекомых к данным патогенам. Адаптации сопровождаются, прежде всего, изменением кутикулярных покровов в случае воздействия грибным патогеном, и кишечника – в случае БТ. В обоих случаях это приводит к изменению иммунной системы в целом, а также антиоксидантной (АО) и детоксицирующих систем. Таким образом, эволюция при формировании резистентности к патогенам идет не только по пути изменения систем организма, способствующих элиминации паразита, но и по пути детоксикации его вторичных метаболитов, а также группы эндобиотиков, возникающих при нарушении физиологических процессов в собственных клетках хозяина.

Учитывая, что патогенезы, вызываемые БТ и *B. bassiana*, значительно различаются по большому количеству признаков, мы рассмотрим их отдельно

для того, чтобы кроме отличий в организации защитных стратегий выявить общие тренды эволюции резистентности насекомых к этим патогенам.

В результате проведенных исследований установлено, что меланизм насекомых сопряжен с повышенной устойчивостью к грибам *B. bassiana*. Кутикула меланистов толще и в ней более активно идет процесс меланизации на ранних этапах микоза. Кроме того, у меланистов выше активность процессов инкапсуляции в гемолимфе, и повышен конституциональный уровень антимикробных белков (АМБ) (Dubovskiy et al., 2013a).

У линии насекомых, селектированных на устойчивость к *B. bassiana*, отмечено увеличение активности феноксидазы (ФО) и, соответственно, процесса меланизации в покровных тканях при заражении грибом. Кроме того, в покровах селектированных насекомых происходила активация целого комплекса защитных реакций, таких как синтез ингибитора металлопротеаз (ИМП), АМБ и компонентов АО системы, которые направлены на уничтожение прорастающих гифальных тел гриба, инактивацию его ферментов и токсинов (Dubovskiy et al., 2013b).



**Рисунок 17.** Развитие иммуно-физиологических защитных механизмов у вошинной огневки против гриба *B. bassiana* при формировании устойчивости к патогену в ходе микроэволюции.

Устойчивость насекомых к грибам у меланистической морфы вошинной огневки и линии, селектированной на устойчивость к грибу *B. bassiana*, определялась рядом общих закономерностей. Ключевые противогрибные

защитные реакции были сосредоточены в покровах. Эти адаптации у устойчивых к грибам насекомых, по-видимому, позволяют им эффективно бороться с патогенами, проникающими через покровы, за счет уничтожения гриба на/в кутикуле, а также запуска клеточных и гуморальных защитных реакций (Рисунок 17).

Следует отметить, что устойчивость и активация защитных систем личинок линии, устойчивой к *B. bassiana*, специфически проявлялась только при заражении данным грибом, но не *M. robertsii*. Известно, что некоторая специфичность иммунного ответа насекомых достигается за счет участия различных путей сигнальной трансдукции и механизмов распознавания компонентов клеточных стенок микроорганизмов (Gottar et al., 2006; Jiang et al., 2010). Это может приводить к различиям в запуске иммунного ответа не только к бактериальным и грибным энтомопатогенам, но и к микроорганизмам одной систематической группы, в частности, к энтомопатогенным аскомицетам разных родов. Вполне вероятно, что специфичность иммунного ответа может быть связана как с особенностями распознавания грибов при их адгезии и прорастании на кутикуле, так и со специфической устойчивостью насекомых к тем или иным факторам вирулентности, отличающимся у *B. bassiana* и *M. robertsii*. Можно предположить, что линия селектированных насекомых эволюционировала в сторону повышенной способности распознавать грибы рода *Beauveria*, что привело к увеличению специфических защитных реакций, связанных с покровными тканями. Однако данный вопрос является открытым и требует дополнительного изучения.

Устойчивость линии, селектированной к БТ, определяется широким спектром конституциональных и индуцибельных защитных реакций иммунной и антиоксидантной систем, а также регенерационных процессов (Рисунок 18). В первую очередь изменения происходят в кишечнике насекомых, что проявляется в снижении активности ряда ключевых ферментов, способных активировать Cry-токсины БТ. В данном случае речь идет об изменении уровня ферментов, необходимого для активации данных токсинов при ограниченном протеолизе, за счет экспрессии ингибиторов металлопротеаз. Как известно, подобная активация Cry-токсинов является необходимым условием для проявления патогенных свойств БТ (Raymond et al., 2010). Следует учитывать, что для проявления токсических свойств активированного Cry-токсина БТ необходимы определенные рецепторы на поверхности эпителиальных клеток кишечника (Pigott, Ellar, 2007). Зарегистрированное снижение уровня рецепторных молекул, аминокептидаз и щелочных фосфатаз может приводить к повышению устойчивости насекомых к данным бактериям. Ранее это было наглядно продемонстрировано на трансгенных растениях, где у насекомых быстро формировалась устойчивость к бактериям БТ в силу того, что растения содержали один или два гена Cry-токсина. Кроме уменьшения концентрации рецепторных молекул (сайтов связывания с токсинами), были обнаружены их мутации, что снижало аффинность к Cry-токсинам (Ferre, Van Rie, 2002; Griffitts, Aroian, 2005).



Таким образом, при постоянном воздействии патогенных бактерий происходит формирование устойчивых линий насекомых, сопровождающееся образованием целого комплекса защитных механизмов. Это, в свою очередь, приводит к снижению биоразнообразия и значительному изменению структуры бактериального сообщества в кишечнике. Вероятно, эволюция защитных реакций насекомых к БТ связана со стратегией «быть подготовленным», и, по-видимому, их адаптивная ценность заключается в быстрой инактивации факторов вирулентности БТ непосредственно в месте развития инфекции – в кишечнике (Рисунок 18).

В ходе эволюции иммунной системы у насекомых формируется уникальный набор адаптаций к определенным группам патогенов. Это связано с особенностями инфекционного процесса, жизненной стратегией патогенов, набором их токсинов и ферментов. Тем не менее, можно отметить ряд общих особенностей эволюции механизмов резистентности насекомых к патогенам. Так, у насекомых линии устойчивых к БТ и линии устойчивой к *B. bassiana*, отмечена экспрессия ингибитора металлопротеаз (IMPI). Следует отметить, что протеазы являются одним из ключевых факторов вирулентности аскомицетов *Beauveria* и *Metarhizium*, а также бактерий БТ (St. Leger et al., 1988; Oppert, 1999; Fedhila et al., 2002; Hu et al., 2014). Таким образом, экспрессия IMPI в покровах зараженных насекомых может сдерживать развитие гриба на начальном этапе инфекционного процесса и очень важно, чтобы этот процесс происходил непосредственно в месте, где прорастают гифальные тела. Блокирование металлопротеаз бактерий у линии насекомых, устойчивой к БТ, также может являться важной адаптацией защитной системы, направленной на снижение концентрации токсина БТ в кишечнике, а также уменьшение воздействия бактериальных металлопротеаз на антимикробные белки насекомых. Необходимо отметить, что экспрессию IMPI у личинок устойчивой к грибу линии мы определяли в покровах, а для линии насекомых, устойчивой к БТ, анализ проводили в кишечнике. В одной из современных гипотез эволюции паразит-хозяинных систем высказывается мнение, что развитие резистентности к грибам может происходить за счет инактивации протеаз энтомопатогенных грибов (Vilcinskas, 2011b). Полученные нами данные не только подтверждают данную гипотезу, но и дополняют тем, что IMPI может играть существенную роль в адаптациях, направленных на защиту от бактериальных патогенов, в первую очередь, против их токсинов.

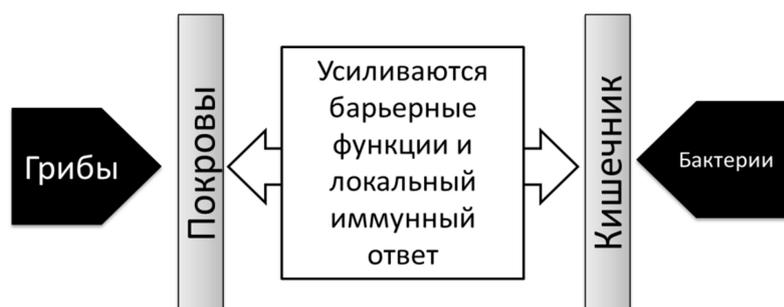
Поддержание функциональной активности органов и тканей, на которые приходится начальные этапы развития патогенов, является важной адаптацией при формировании резистентности как к грибам, так и к бактериям. Развитие грибного и бактериального патогенеза сопровождается синтезом большого количества токсинов и ферментов, повреждающих клетки хозяина (Dubovskiy et al., 2010, 2011; Дубовский и др., 2011). Активная меланизация при микозе и процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) при бактериозе являются источниками активированных кислородных метаболитов (АКМ) (Slepneva et al., 2003; Дубовский и др., 2005). Эволюция резистентности к БТ была сопряжена с развитием защиты от данных процессов в кишечнике и

жировом теле, а к грибам – в покровах. Замена разрушенных клеток, репаративные процессы и поддержание ОВ баланса в поврежденных тканях могут быть важными факторами, обеспечивающим выздоровление насекомых (Dubovskiy et al., 2008b). Кроме того, эпителиальные клетки кишечника и эпидермальные клетки покровов играют важную роль в функционировании защитных реакций. В частности, участвуют в локальном синтезе ферментов и АМБ. Несомненно, развитие репарационной и антиоксидантной систем является одной из ключевых адаптаций при микроэволюционном формировании резистентности к патогенным грибам и бактериям.

Общей тенденцией в ходе микроэволюции резистентности насекомых к бактериям и грибам является повышение уровня экспрессии АМБ. Личинки вошинной огневки с повышенной устойчивостью к БТ обладали увеличенной конституциональной и индуцированной экспрессией галлериомицина, галиомицина, Gloverina, цекропина-Д и 6-Тох в кишечнике. АМБ могут участвовать непосредственно в уничтожении бактериальных клеток, причем при бактериозе БТ их мишенью являются не только бактерии БТ, но и другие представители бактериального сообщества, которые могут быть одним из дополнительных факторов патогенного действия за счет проникновения в полость тела насекомого в местах разрушения кишечника. У насекомых, устойчивых к *B. bassiana*, повышен базовый уровень экспрессии галлериомицина и галиомицина в покровах. Кроме того, уровень их экспрессии увеличивался при заражении *B. bassiana*. Галлериомицин и галиомицин описаны как АМБ с противогрибными свойствами (Lee et al., 2004; Brown et al., 2008), хотя пока не совсем ясно, какое значение имеют данные АМБ при развитии грибной инфекции. Не исключено, что высокий уровень АМБ способен задержать развитие грибной инфекции в покровах. С другой стороны, повышенный уровень АМБ при микозах может быть необходим насекомым для защиты от вторичных, особенно кишечных, бактериальных инфекций. Следует отметить, что АМБ могут способствовать активации всего комплекса защитных реакций насекомого за счет разрушения клеток бактерий и грибов (Kanost et al., 2004; Jiang et al., 2010). Вероятно, в данном случае компоненты разрушенных микроорганизмов будут выполнять иммуностимулирующие функции и вызывать более выраженную и раннюю активацию иммунной системы у устойчивых насекомых.

Интересно, что у меланистической морфы вошинной огневки «цена» резистентности выражается в двукратном снижении плодовитости. У селективных линий повышение устойчивости к бактериям и грибам не было сопряжено со снижением популяционных показателей. Вероятно, это связано с особенностями защитной стратегии меланистов, требующих больших энергетических «затрат»: утолщение и меланизация кутикулы, повышение числа гемоцитов. Отсутствие «цены» резистентности у селективных линий может быть связано с меньшим уровнем их резистентности. По-видимому, ресурсные затраты («цена») при формировании резистентности могут зависеть от давления отбора и характера доминирования признака, но в наибольшей степени от типа развившихся адаптаций.

Анализируя основные направления эволюции резистентности насекомых к грибным и бактериальным патогенам, можно сделать вывод о том, что развитие устойчивости насекомых происходит за счет комплексного усиления иммунологических и физиологических защитных реакций в месте проникновения патогена, то есть происходит своеобразная «локализация» иммунного ответа. Для грибного патогена данные адаптации сосредоточены в покровах, а для бактериального - в кишечнике, что не удивительно, поскольку покровы и кишечник являются местом, где шансы остановить инфекцию и не допустить ее развитие в гемоцеле достаточно высоки. Если патоген проникает в гемоцель, насекомым становится гораздо сложнее «контролировать» инфекцию из-за открытой кровеносной системы, а также различных адаптаций патогенов к блокированию иммунного ответа ( Рисунок 19).



**Рисунок 19.** Эволюция механизмов резистентности насекомых к энтомопатогенным бактериям и грибам.

Еще одним трендом в эволюции защитных систем является развитие у насекомых стратегии, которую условно можно назвать «быстрый ответ». Это подразумевает поддержание в активном состоянии ряда систем, прежде всего связанных с инактивацией патогена или его токсинов, на начальных стадиях инфекционного процесса. В целом данные адаптации приводят к более высокой реактивности организма по отношению к патогенным микроорганизмам. Способность к многократной резкой активации ряда иммунных и детоксицирующих реакций непосредственно при заражении, вероятно, позволяет насекомым, с одной стороны, запускать защитные реакции непосредственно в месте развития инфекции или выброса токсинов, а с другой – избежать высокой «цены» резистентности за постоянно повышенный конституциональный уровень защитных реакций. Возможно, степень реализации данной стратегии зависит от особенностей патогена, уровня резистентности и времени эволюционных взаимоотношений в системе паразит-хозяин.

## ВЫВОДЫ

1. Сублетальная кишечная бактериальная инфекция, вызванная *Bacillus thuringiensis*, приводит к активации реакций клеточного и гуморального иммунитета в гемоцеле личинок вощинной огневки *Galleria mellonella*, а полублетальная - подавляет все звенья иммунного ответа в гемоцеле насекомых.
2. Развитие сублетальной и острой бактериальной инфекции приводит к активации экспрессии антимикробных белков (галлериомицина, галиомицина, цекропина-Д, 6-Тох и гловерина) как «локально», в кишечнике, так и «системно», в жировом теле личинок вощинной огневки. При этом экспериментальное подавление экспрессии гловерина методом РНК-интерференции увеличивает восприимчивость насекомых к бактериальной инфекции.
3. Развитие бактериоза, вызванного *Bacillus thuringiensis* приводит к нарушению окислительно-восстановительного баланса в организме насекомых. На начальном этапе заражения происходит активация комплекса ферментативных и неферментативных антиоксидантов в кишечнике личинок вощинной огневки. Подавление экспрессии глутатион пероксидазы увеличивает восприимчивость насекомых к бактериальной инфекции.
4. На начальных этапах кишечного бактериоза личинок вощинной огневки происходит значительная активация индуцибельного ингибитора металлопротеаз и регенерационных процессов в кишечнике, а подавление экспрессии IMP1 с помощью РНК-интерференции увеличивает восприимчивость насекомых к бактериальной инфекции.
5. Селекция вощинной огневки на устойчивость к *Beauveria bassiana* (двадцать пять поколений) или к *Bacillus thuringiensis* (двадцать поколений) не приводит к снижению в выживаемости, весе куколок и плодовитости насекомых по сравнению с контрольными линиями. С другой стороны, меланистическая морфа вощинной огневки, обладающая врождённой устойчивостью к грибам *B. bassiana*, характеризуется более быстрым личиночным развитием, низким весом куколок и низкой плодовитостью по сравнению со светлой морфой.
6. У селектированной к *Bacillus thuringiensis* линии вощинной огневки устойчивость к данным бактериям увеличивается в восемь раз. Резистентность к бактериям не изменяется в течение трех поколений без воздействия фактора отбора. В кишечнике устойчивых насекомых происходит повышение уровня защитных реакций, связанных с инактивацией бактериальных Сту-токсинов с помощью индуцибельного ингибитора металлопротеаз, аминопептидаз и щелочных фосфатаз, а также реакций, связанных с активацией антиоксидантной системы и повышением регенерации тканей.
7. В жировом теле и кишечнике линии вощинной огневки, устойчивой к *Bacillus thuringiensis*, повышается уровень экспрессии антимикробных белков. Заражение бактериями *B. thuringiensis* приводит к значительному сдвигу в

составе доминантов бактериального сообщества от типа *Firmicutes* к типу *Proteobacteria*. При этом у личинок устойчивой линии снижается количество представителей р. *Pseudomonas* и биоразнообразие всех бактерий в кишечнике.

8. Личинки меланистической морфы вошинной огневки устойчивее к грибу *Beauveria bassiana* в тринадцать раз по сравнению с личинками светлой морфы. Меланисты, по сравнению с ахромистами, обладают комплексом анатомических и иммунологических адаптаций против грибной инфекции. Кутикула меланистов толще, содержит больше меланинов и в ней интенсивнее развивается процесс меланизации при микозе. В гемолимфе меланистов повышается количество гемоцитов, более активно идет процесс инкапсуляции и синтез антимикробных белков.

9. У селектированной к *Beauveria bassiana* линии вошиной огневки формируется устойчивость к данным грибам, однако устойчивости к другому виду гриба (*Metarhizium robertsii*) не возникает.

10. Эволюция резистентности к энтомопатогенному грибу *Beauveria bassiana* приводит к усилению неспецифических и специфических защитных реакций, увеличивающих барьерные функции покровов насекомых. В частности, происходит повышение фенолоксидазной активности, синтеза индуцибельного ингибитора металлопротеаз и антимикробных белков, уровня репарации и регенерации, а также активности антиоксидантной системы.

#### **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ ИЗДАНИЯХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ВАК:**

Glupov, V.V. Application of the method NBT-reduction for studies on the production of reactive oxygen species in Insect haemocytes / V.V. Glupov, M.F. Khvoshevskaya, Y.L. Lozinskaya, **I.M. Dubovski**, V.V. Martem'yanov, J.Y. Sokolova // *Cytobios.* – 2001. – V.106. – P.165–178.

Омельянчук, Л.В. Регуляторный ген фенолоксидазной активности у *Drosophila melanogaster* / Л.В. Омельянчук, **И.М. Дубовский**, В.В. Глупов // *Генетика.* – 2001. – Т.37. – С.1062-1067. Переводная версия: *Russian Journal of Genetics.* 2001. – V. 37. – № 8. – P. 884–887.

Glupov, V.V. Influence of the fungal infection on the production of reactive metabolites and the antioxidant state of haemolymph of *Galleria mellonella* larvae / V.V. Glupov, I.A. Slepneva, V.V. Serebrov, M.F. Khvoshevskaya, V.V. Martem'yanov, **I.M. Dubovskiy**, V.V. Khramtsov // *Russian Entomological Journal.* – 2003. – V.12 – P.103–108.

Zvereva, E.L. Activity and heavy metal resistance of non-specific esterases in leaf beetle *Chrysomela lapponica* from polluted and unpolluted habitats / E.L. Zvereva, V.V. Serebrov, V.V. Glupov, **I.M. Dubovskiy** // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology.* – 2003. – V.135. – P.383–391.

Хвощевская, М.Ф. Изменение активности супероксиддисмутазы в разных органах личинок большой вошиной огневки (*Galleria mellonella* L., Lepidoptera: Pyralidae) при заражении *Bacillus thuringiensis ssp. galleriae* / М.Ф. Хвощевская,

**И.М. Дубовский**, В.В. Глупов // Известия РАН, сер.биол. – 2005. – №6 – С.613-619. Переводная версия: *Biology Bulletin*. – 2005. – V. 32, № 1. – P. 52–56.

**Дубовский, И.М.** Уровень и активность антиоксидантов в кишечнике личинок *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) при пероральном инфицировании бактериями *Bacillus thuringiensis ssp.galleriae* / И.М. Дубовский, О.А. Олифиренко, В.В. Глупов // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2005 – Т.41. – С.18–22. Переводная версия: *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2005. – V. 41, № 1. – P. 20–25.

Бахвалов, С. А. Основные причины низкой эффективности микробиологических препаратов в лесозащите России / С.А. Бахвалов, В.В. Мартемьянов, Г.П. Пешков, **И.М. Дубовский** // Лесное хозяйство. – 2006. – № 7. – С. 47–48.

Мартемьянов, В. В. Влияние таниновой кислоты на развитие и резистентность непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) против вирусной инфекции / В.В. Мартемьянов, С.А. Бахвалов, **И.М. Дубовский**, В.В. Глупов, Н.Ф. Салахутдинов, Г.А. Толстикова // Доклады академии наук. – 2006. Т. 409. № 3. – С. 407–410. Переводная версия: *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2006. – V. 409. – P. 219–222.

Комаров, Д.А. Генерация супероксидного радикала и перекиси водорода в гемолимфе насекомых в процессе иммунного ответа / Д.А. Комаров, И.А. Слепнева, **И.М. Дубовский**, Е.В. Гризанова, В.В. Хромцов, В.В. Глупов // Доклады Академии наук. – 2006. –Т. 411, № 3. – С. 420–423. Переводная версия: *Doklady Biological Sciences*. – 2006. – V. 411. – P. 482–485.

**Дубовский, И.М.** Изучение протеиназ в кишечнике имаго клопа вредная черепашка *Eurygaster integriceps* Put. (Hemiptera, Scutelleridae) различных поколений / И.М. Дубовский, Е.В. Гризанова, Е.А. Боярищева, В.Я. Исмаилов, В.В. Глупов // Евразийский энтомологический журнал. – 2006. – Т.5, № 4. – С. 271–275.

Крюков, В.Ю. Перспективы применения энтомопатогенных гифомицетов (Deuteromycota, Nuyphomycetes) для регуляции численности насекомых / В.Ю. Крюков, Г.Р. Леднев, **И.М. Дубовский**, В.В. Серебров, М.В. Левченко, В.П. Ходырев, А.О. Сагитов, В.В. Глупов // Евразийский энтомологический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 195–204.

Крюкова, Н.А. Формирование клеточного иммунного ответа *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera, Piralidae) при паразитировании *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera, Braconidae) / Н.А. Крюкова, **И.М. Дубовский**, Е.В. Гризанова, Е.А. Наумкина, В.В. Глупов // Евразийский энтомологический журнал. – 2007. – Т. 6, № 4. – С. 361–364.

Слямова, Н.Д. Активность детоксицирующих ферментов у двупятнистого сверчка *Gryllus bimaculatus* De Geer (Ensifera, Gryllidae) на различных стадиях онтогенеза / Н.Д. Слямова, **И.М. Дубовский**, А.Б. Белгибаева, А. Адилханкызы, В.В. Глупов // Евразийский энтомологический журнал. – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 189–193.

Крюков, В.Ю. Усниновая кислота – перспективный синергист для биопрепаратов на основе энтомопатогенных микроорганизмов / В.Ю. Крюков, В.В. Мартемьянов, М.П. Половинка, О.А. Лузина, **И.М. Дубовский**, В.В. Серебров, В.П. Ходырев, А.А. Малярчук, О.Н. Гербер, О.Н. Ярославцева, Е.А. Боярищева, М.В. Левченко, В.В. Глупов, Н.Ф. Салахутдинов, Г.А. Толстикова //

Доклады академии наук. – 2008. – Т. 423, № 2. – С. 279–282. Переводная версия: Doklady Biological Sciences. – 2008. – V. 423. – P. 416–418.

Алексеев, А.А. Физиолого-биохимические различия одиночных и стадных гусениц лугового мотылька *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Pyralidae) / А.А. Алексеев, В.В. Серебров, О.Н. Гербер, **И.М. Дубовский**, В.В. Глупов, М.А. Ушакова, И.Ю. Раушенбах // Доклады Академии наук. – 2008. – Т. 422, № 2. – С. 270–272. Переводная версия: Doklady Biological Sciences. – 2008. – Т. 422, № 1. – С. 316–317.

**Dubovskiy, I.M.** Effect of the bacterial infection on the antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of larvae *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) / I.M. Dubovskiy, В.В. Martemyanov, Y.L. Vorontsova, M.J. Rantala, E.V. Gryzanova, V.V. Glupov // Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology. – 2008. – V 148, № 1. – P. 1–5.

**Dubovskiy, I.M.** Phagocytic activity and encapsulation rate of *Galleria mellonella* larvae hemocytes during bacterial infection by *Bacillus thuringiensis* / I.M. Dubovskiy, N.A. Krukova, V.V. Glupov // Journal of Invertebrate Pathology. – 2008. – V.98, № 3. – P. 360–362.

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.Д. Рантала, **И.М. Дубовский**, Э.Э. Шульц, И.А. Белоусова, А.Г. Стрельников, В.В. Глупов // Экология. – 2009. – № 6. – С. 459–464. Переводная версия: Russian Journal of Ecology. – 2009. – V.40, № 6. – P. 434–439.

Глупов, В.В. Генерация активированных кислородных метаболитов при формировании иммунного ответа у членистоногих / В.В. Глупов, И.А. Слепнева, **И.М. Дубовский** // Труды Зоологического института РАН. – 2009. – Т. 313, № 3. – С. 297–307.

Komarov, D.A. Pathogen-targeted hydroxyl radical generation during melanization in insect hemolymph: EPR study of a probable cytotoxicity mechanism / D.A. Komarov, A.D. Ryazanova, I.A. Slepneva, V.V. Khramtsov, **I.M. Dubovskiy**, V.V. Glupov // Applied Magnetic Resonance. – 2009. – V.35, № 4. – P. 495–501.

**Dubovskiy, I.M.** Activity of detoxificative enzymes system and encapsulation rate in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* larvae under organophosphorus insecticide treatment and entomopathogenic fungus *Metharizium anisopliae* infection / I.M. Dubovskiy, V.Yu. Kryukov, G.V. Benkovskaya, O.N. Yaroslavtseva, E.V. Surina, V.V. Glupov // Евразийский энтомологический журнал. – 2010. – Т.9, № 4. – С. 577–582.

**Дубовский, И.М.** Генерация активированных кислородных метаболитов и активность антиоксидантов в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) при развитии процесса инкапсуляции / И.М. Дубовский, Е.В. Гризанова, Е.А. Черткова, И.А. Слепнева, Д.А. Комаров, Я.Л. Воронцова, В.В. Глупов // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2010. – Т. 46, № 1. – С. 30–36. Переводная версия: Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2010. – V. 46, № 1. – P. 35–43.

**Dubovskiy, I.M.** The effects of dietary nickel on the detoxification enzymes, innate immunity and resistance to the fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella* / I.M. Dubovskiy, E.V. Grizanova, N.S.

Ershova, M.J. Rantala, V.V. Glupov // *Chemosphere*. – 2011. – V. 85, № 1. – P. 92–96.

**Дубовский, И.М.** Активность неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз у личинок азиатской саранчи *Locusta migratoria* при развитии грибной инфекции *Metarhizium anisopliae* / И.М. Дубовский, Н.Д. Слямова, В.Ю. Крюков, О.Н. Ярославцева, М.В. Левченко, А.Б. Белгибаева, А. Адилханкызы, В.В. Глупов // *Зоологический журнал*. – 2011. – Т. 90, №11. – С. 1360–1364. Переводная версия: *Entomological Review*. – 2012. – V. 92, № 1. – P. 27–32.

Крюков, В.Ю. Сравнительный анализ двух штаммов энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* с разными жизненными стратегиями / В.Ю. Крюков, **И.М. Дубовский**, О.Н. Ярославцева, М.В. Левченко, Н.Д. Слямова, А.Б. Белгибаева, В.П. Ходырев, Г.Р. Леднев, В.В. Глупов // *Микология и фитопатология*. – 2011. – Т. 45, Вып. 2. – С. 164–176.

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, Ya.L. Vorontsova, I.A. Slepneva, V.V. Glupov // *Journal of Insect Physiology*. – 2011. – V. 57, № 6. – P. 796–800.

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. – V. 6, № 4. – P. 507–518.

Крюков, В.Ю. Продукция кордицепина и аденозина в мицелии и культуральной жидкости изолятов *Cordyceps militaris* / В.Ю. Крюков, А.Е. Кухаренко, **И.М. Дубовский**, В.В. Глупов // *Микология и фитопатология*. – 2012. – Т. 46, № 6. – С. 390–396.

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. – V. 38, № 3. – P. 295–305.

**Дубовский, И. М.** Увеличение активности иммунной системы вошинной огневки *Galleria mellonella* и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* под влиянием фосфорорганического инсектицида / И.М. Дубовский, О.Н. Ярославцева, В.Ю. Крюков, Г.В. Беньковская, В.В. Глупов // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. – 2013. – Т. 49, № 6. – С. 428–432. Переводная версия: *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2013. – V. 49, №6. – P. 592–596.

Butt, T.M. *Metarhizium anisopliae* pathogenesis of mosquito larvae: A verdict of accidental death. / T.M. Butt, B.P.J. Greenfield, C. Greig, T.G.G. Maffei, J.W.D. Taylor, J. Piasecka, E. Dudley, A. Abdulla, **I.M. Dubovskiy**, I. Garrido-Jurado, E. Quesada-Moraga, M.W. Penny, D.C. Eastwood // *PLoS ONE*. – 2013. – V. 8, № 12. – e81686.

**Dubovskiy, I.M.** More than a colour change: Insect melanism, disease resistance and fecundity / I.M. Dubovskiy, M.M.A. Whitten, V.Y. Kryukov, O.N. Yaroslavtseva, E.V. Grizanova, C. Greig, K. Mukherjee, A. Vilcinskas, P. Mitkovets,

V.V. Glupov, T.M. Butt // Proceedings of Royal Society. Biology. – 2013. – V. 280, № 1763. – 20130584.

**Dubovskiy, I.M.** Can Insects Develop Resistance to Insect Pathogenic Fungi? / I.M. Dubovskiy, M.M.A. Whitten, O.N. Yaroslavtseva, C. Greig, V.Y. Kryukov, E.V. Grizanova, K. Mukherjee, A. Vilcinskis, V.V. Glupov, T.M. Butt // PloS One. – 2013. – V. 8, № 4. – e60248.

Крюкова, Н.А. Динамика кальция в цитозоле гемоцитов личинок *Galleria mellonella* при клеточном иммунном ответе / Н.А. Крюкова, **И.М. Дубовский**, Е.А. Черткова, Е.В. Гризанова, В.В. Глупов // Евразийский энтомологический журнал. – 2013. – Т. 12, № 5. – С. 421–424.

Ходырев, В.П. Восприимчивость личинок *Anopheles messeae* Fall и *Culex pipiens pipiens* L к энтомопатогенным грибам *Metarhizium* / В.П. Ходырев, **И.М. Дубовский**, В.Ю. Крюков, В.В. Глупов // Сибирский экологический журнал. – 2014. – Т. 12, № 3. – С. 435–438. Переводная версия: Contemporary Problems of Ecology. – 2014. – V. 7, №3. – P. 334–337.

Grizanova, E. V. Contributions of cellular and humoral immunity of *Galleria mellonella* larvae in defence against oral infection by *Bacillus thuringiensis* / E.V. Grizanova, **I.M. Dubovskiy**, M.M.A. Whitten, V.V. Glupov // Journal of Invertebrate Pathology – 2014. – V. 119. – P. 40–46.

Крюков, В.Ю. Инсектицидное и иммуносупрессивное действие аскомицета *Cordyceps militaris* на личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* / В.Ю. Крюков, О.Н. Ярославцева, **И.М. Дубовский**, М.В. Тюрин, Н.А. Крюкова, В.В. Глупов // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2014. – № 3. – С. 296–303. Переводная версия: Biology Bulletin. – 2014. – V. 41, №3. – P. 276–283.

Martemyanov, V.V. Leaf surface lipophilic compounds as one of the factors of silver birch chemical defense against larvae of gypsy moth / V.V. Martemyanov, S.V. Pavlushin, **I.M. Dubovskiy**, I.A. Belousova, Y.V. Yushkova, S.V. Morosov, E.I. Chernyak, V.V. Glupov // PLoS ONE. – 2015. – V.10, №3. – e0121917.

Martemyanov, V.V. Asynchrony between host plant and insects-defoliator within a tritrophic system: The role of herbivore innate immunity / V.V. Martemyanov, S.V. Pavlushin, **I.M. Dubovskiy**, Y.V. Yushkova, S.V. Morosov, E.I. Chernyak, V.M. Efimov, T. Ruuhola, V.V. Glupov // PLoS ONE. – 2015. – V. 10, №6. – e0130988.

Kangassalo, K. Intra- and trans-generational effects of larval diet on susceptibility to an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, in the greater wax moth, *Galleria mellonella* / K. Kangassalo, T.M. Valtonen, D. Roff, M. Pölkki, **I.M. Dubovskiy**, J. Sorvari, M.J. Rantala // Journal of Evolutionary Biology. – 2015. – V.28, №8. – P. 1453–1464.

#### Патенты:

Патент 2328493. Российская Федерация, МПК: C07D307/91, A01P7/04. Применение усниновой кислоты в качестве синергиста инсектицидов на основе энтомопатогенных микроорганизмов / Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф. Лузина О.А., Глупов В.В., Серебров В.В., **Дубовский И.М.**, Мартемьянов В.В., Крюков В.Ю., Патентообладатели – НИОХ СО РАН, ИСиЭЖ СО РАН. – опубл. 10.07.2008. Бюл. № 19. 11 с.