

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения
Российской академии наук**

На правах рукописи

УДК 575.82

Дубовский Иван Михайлович

**ЭВОЛЮЦИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
ВОЩИННОЙ ОГНЕВКИ *GALLERIA MELLONELLA* (L.)
К ЭНТОМОПАТОГЕННЫМ БАКТЕРИЯМ И ГРИБАМ**

03.02.05 – энтомология

Диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор

Глунов Виктор Вячеславович

Новосибирск– 2015

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
1.1. Бактерии <i>Bacillus thuringiensis</i> , основные факторы вирулентности и механизм действия.....	19
1.2. Энтомопатогенные грибы <i>Metarhizium robertsii</i> и <i>Beauveria bassiana</i>	27
1.3. Механизмы резистентности насекомых к бактериальным и грибным инфекциям	31
1.3.1. Внешние системы защиты насекомых	31
1.3.1.1. Покровы	31
1.3.1.2. Кишечник.....	35
1.3.2. Реакции клеточного и гуморального иммунитета.....	39
1.3.2.1. Клеточные иммунные реакции.....	39
1.3.2.2. Гуморальные иммунные реакции.....	43
1.3.3. Антиоксидантная и детоксицирующая системы	50
1.4. Заключение	57
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	63
2.1. Насекомые	63
2.2. Энтомопатогенные микроорганизмы	63
2.2.1. Бактерии.....	63
2.2.1.1. Заражение насекомых бактериями и моделирование сублетальной и полулетальной инфекции	64
2.2.1.2. Селекция насекомых на устойчивость к бактериям <i>B. thuringiensis</i> .	64
2.2.2. Грибы	65
2.2.2.1. Заражение грибами.....	66

2.2.2.2. Селекция на устойчивость к грибу <i>B. bassiana</i>	66
2.2.3. Характеристики адгезии и роста грибов на насекомых.....	67
2.2.3.1. Уровень адгезии конидий на кутикуле насекомых.....	67
2.2.3.2. Уровень прорастания конидий на кутикуле насекомых и ее экстрактах.....	68
2.2.3.3. Определение гриба в гемолимфе насекомых.....	69
2.2.4. Анализ микрофлоры в кишечнике насекомых.....	69
2.3. Изучение защитных систем насекомых.....	70
2.3.1. Подготовка образцов тканей и органов.....	70
2.3.2. Измерение толщины кутикулы.....	72
2.3.3. Оценка активности реакций клеточного и гуморального иммунитета... ..	72
2.3.3.1. Определение активности фагоцитоза.....	72
2.3.3.2. Определение интенсивности инкапсуляции.....	73
2.3.3.3. Определение активности фенолоксидаз в гемоцитах.....	73
2.3.3.4. Определение активности фенолоксидаз в плазме гемолимфы.....	74
2.3.3.5. Подсчет общего количества гемоцитов в гемолимфе.....	74
2.3.3.6. Определение лизоцим-подобной антибактериальной активности....	75
2.3.3.7. Определение индекса коагуляции гемолимфы.....	75
2.3.4. Оценка активности антиоксидантной и детоксицирующей систем.....	76
2.3.4.1. Определение активности каталазы.....	76
2.3.4.2. Определение активности супероксиддисмутазы.....	76
2.3.4.3. Определение концентрации тиолсодержащих соединений.....	77
2.3.4.4. Определение активности глутатион-S-трансфераз.....	77
2.3.4.5. Измерение концентрации малонового диальдегида.....	78

2.3.4.6. Оценка генерации активированных кислородных метаболитов	78
2.3.5. Определение концентрации белка.....	79
2.3.6. Оценка уровня экспрессии различных генов в кишечнике, жировом теле и покровах насекомых	79
2.3.7. Подавление экспрессии (сайленсинг) различных генов защитной системы с помощью РНК интерференции.....	81
2.4. Измерение показателей индивидуального развития насекомых и популяционных характеристик	82
2.5. Реактивы	82
2.6. Статистическая обработка данных	82
ГЛАВА 3. Основные защитные механизмы воцинной огневки при развитии резистентности к бактериям <i>B. thuringiensis</i>.....	84
3.1. Бактериальный патогенез и развитие резистентности к <i>B. thuringiensis</i>	86
3.2. Вес куколок и плодовитость воцинной огневки при формировании резистентности к <i>B. thuringiensis</i>	93
3.3. Активация бактериальных Cry-токсинов и их связывание с рецепторами в кишечнике насекомых	94
3.4. Процессы регенерации и репарации в кишечнике насекомых при бактериозе <i>B. thuringiensis</i>	100
3.5. Иммунный ответ насекомых при бактериозе <i>B. thuringiensis</i>	102
3.5.1. Реакции клеточного и гуморального иммунитета у насекомых при заражении бактериями <i>B. thuringiensis</i>	102
3.5.2. Показатели иммунитета у линий воцинной огневки с различной чувствительностью к <i>B. thuringiensis</i>	117
3.6. Окислительно-восстановительный баланс у насекомых при бактериозе <i>B. thuringiensis</i>	127

3.6.1. Роль антиоксидантной системы в кишечнике при бактериозе <i>B. thuringiensis</i>	127
3.6.2. Окислительно-восстановительный баланс в кишечнике и жировом теле насекомых с различной чувствительностью к <i>B. thuringiensis</i>	135
3.6.3. Уровень экспрессии белков теплового шока при бактериозе <i>B. thuringiensis</i>	145
3.7. Состав микрофлоры кишечника насекомых при бактериозе вызываемом <i>B. thuringiensis</i>	149
Заключение к главе 3	153
ГЛАВА 4. Внутривидовая микроэволюционная стратегия устойчивости вощинной огневки против энтомопатогенных грибов <i>B. bassiana</i>.....	158
4.1. Восприимчивость меланистической и ахромистической морф вощинной огневки к грибам <i>B. bassiana</i>	160
4.2. Кутикулярные защитные механизмы меланистической и ахромистической морф.....	162
4.3. Клеточный и гуморальный иммунный ответ личинок меланистической и ахромистической морф.....	166
4.4. Морфометрические и популяционные показатели насекомых меланистической и ахромистической морф.....	173
Заключение к главе 4	174
ГЛАВА 5. Формирование механизмов резистентности к микроорганизмам у личинок вощинной огневки <i>G. mellonella</i> при направленном отборе на устойчивость к <i>B. bassiana</i>	179
5.1. Селекция насекомых на устойчивость грибу <i>B. bassiana</i> и восприимчивость селектированной линии к энтомопатогенным грибам.....	179
5.2. Иммунный ответ у личинок линии вощинной огневки селектированной на устойчивость к грибу <i>B. bassiana</i>	182

5.3. Морфометрические и популяционные показатели линии вошинной огневки устойчивой к грибу <i>B. bassiana</i>	196
Заключение к главе 5	198
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	203
ВЫВОДЫ	213
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	216
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	217
ПРИЛОЖЕНИЕ	272

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Кoeволюционные 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 эпикутикулы за счет гидрофобных взаимодействий, активируются и

прорастают через кутикулу, используя механическое давление и гидролитические «ферменты атаки» (Charnley, 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 Сгу-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 патогенозов 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 δ -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 вошинной огневке проведены эксперименты по сайленсингу генов с помощью РНК-интерференции. Установлено, что подавление экспрессии гловерина,

индуцибельного ингибитора металлопротеаз (ИМПИ) и глутатион пероксидазы увеличивает восприимчивость насекомых к бактериальной инфекции, вызванной БТ. Получены оригинальные данные о вкладе ИМПИ и регенерационных процессов в механизмы резистентности воцинной 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 патогенезов 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 рНК. 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. Вилсингасу (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

Активное развитие исследований по патологии насекомых началось с середины 19-го века с работ Пастера по изучению болезней тутового шелкопряда (Штейнхауз, 1952). Примерно в это же время микологи начали описывать грибы, паразитирующие на различных насекомых, а в 1879 г. Мечников в России поставил первые опыты по использованию гриба *Metarhizium anisopliae* для заражения насекомых вредителей. С начала двадцатого столетия начались уже более глубокие исследования инфекционных болезней насекомых, направленные на понимание иммунного ответа хозяев. В частности, большое значение имели работы Пэйо во Франции (1913-1944). Метальников и его сотрудники (1914-1935) также разрабатывали основные проблемы, имеющие отношение к иммунитету насекомых. В середине 20-го века исследования механизмов резистентности насекомых и, в частности, иммунитета активно развивались при участии таких ученых как Э. Штэйнхауз (1945), Ф.Л. Бух (1940), М.Б. Блок (1937, 1938, 1940), В.И. Полтева (1958) и др (Штейнхауз, 1952). К концу двадцатого столетия иммунология насекомых активно развивалась с привлечением новых молекулярно-генетических и биохимических методов. Были описаны новые компоненты иммунной системы, а также проведены глубокие исследования патогенов насекомых. Эти данные дали "толчок" биомедицинским исследованиям, а также развитию биологических методов контроля численности насекомых вредителей сельского и лесного хозяйства.

1.1. Бактерии *Bacillus thuringiensis*, основные факторы вирулентности и механизм действия

Берлинер в 1915 году описал спорообразующую бактерию, названную им *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (БТ) и выделенную из больных гусениц

средиземноморской мельничной огневки *Ephestia kuhniella* Zell. Бактерии БТ являются широко распространенным возбудителем бактериальных болезней насекомых в природе, а также активно используются для создания биопестицидов, применяемых для контроля численности вредителей сельского и лесного хозяйств, насекомых переносчиков болезней человека и животных (Vankova, Purrini, 1979; Paw, Travers, 1991; Kryukov et al., 2009). *B. thuringiensis* это палочковидные факультативно анаэробные бактерии, обычно образуют короткие цепи. Бактерии подвижны за счет жгутиков – перитрихий; образуют споры овальной формы, расположенные центрально или парацентрально. Бактерии БТ продуцируют кристаллические включения белковой природы рядом со спорой и ряд других токсинов во время вегетативного роста. Эти кристаллы и метаболиты бактерий токсичны для насекомых, благодаря чему бактерии БТ могут проявлять энтомопатогенные свойства. Кроме того, Cry токсины БТ используют при создании трансгенных растений, обладающих инсектицидными свойствами (Maagd et al., 2001, 2003; Griffiths, Aroian, 2005; Schnepf et al., 1998; Штерншис и др., 2004; Штерншис и др., 2010). Естественный путь проникновения БТ в организм насекомых – пероральный (Vallet-Gely et al., 2008). В случае БТ инфекции, первичный барьер на пути патогена – это кишечник. Принято считать, что основной вклад в развитие патогенеза БТ вносит эндотоксин (Pigott, Ellar, 2007). Однако, ряд других токсинов и ферментов также принимают участие в инфекционном процессе. А. Хемпел дал следующую классификацию токсинов БТ: α -экзотоксин - фермент растущей бактерии, а именно фосфолипаза С; β -экзотоксин – термоустойчивый токсин нуклеотидной природы, выделяемый бактериальной клеткой в окружающую среду; γ -экзотоксин – неидентифицированная фосфолипаза; δ -эндотоксин – параспоральные белковые кристаллы (Бурцева и др., 2001). Кроме того, в процессе жизнедеятельности бактерии БТ синтезируют ферменты и антибактериальные вещества (Бурцева и др., 2001). Развитие молекулярно-генетических методов позволило в последние годы дополнить состав токсинов и провести более точную идентификацию (de Maagd et al., 2001; Nielsen-LeRoux et al., 2012).

На данный момент описано множество ферментов и токсинов БТ, которые являются факторами вирулентности по отношению к насекомым различных отрядов. Параспоральные белковые кристаллы БТ синтезируются при споруляции (de Maagd et al., 2001). В кишечнике насекомых они растворяются до протоксинов под действием pH (Pardo-Lopez et al., 2013). Затем происходит активация протоксинов до Cry токсинов под действием протеаз хозяина и металлопротеаз бактерий (Rukmini, 2000). *Cry токсины* специфически связываются с рецепторами эпителиальных клеток кишечника и образуют поры в мембранах, что приводит к разрушению клеток и дисфункции кишечника. При этом большинство остальных токсинов (фосфолипазы, гемолизины, VIP и др.) синтезируются вегетативными клетками БТ уже в кишечнике, в начале стационарной фазы с участием плейотропного регулятора PlcR (Agaisse et al., 1999; Salamitou et al., 2000). Синтез данных метаболитов приурочен к инфекционному процессу и направлен на преодоление защитных систем хозяина (Nielsen-LeRoux et al., 2012). После гибели хозяина, в так называемую некротрофную фазу развития БТ, состав синтезируемых бактериями веществ меняется и связан разложением органики и конкуренцией за субстрат с другими микроорганизмами (Dubois et al., 2012). Следует отметить, что некротрофная фаза развития БТ в погибшем хозяине схожа с условиями в почве, где бактерии вынуждены конкурировать с обширной группой микроорганизмов (Dubois et al., 2012).

Вегетативные клетки большинства штаммов БТ продуцируют фосфолипазы С (α и γ экзотоксины) (Damgaard et al., 1996). *Фосфолипазы*, синтезируемые БТ, термолабильны и классифицируются по типу субстратов-фосфолипидов (Ивинскене, 1978; Ikezawa et al., 1983; Volwerk et al., 1989). Токсичность фосфолипаз для насекомых была показана как при пероральном, так и при интрагемоцелюлярном воздействии. Установлено, что воздействие фосфолипаз приводит к лизису клеток насекомых (Krieg, 1971) и позвоночных животных (Faust, Bulla, 1982). Следует отметить, что фосфолипазы не обладают строгой

специфичностью, а их активность зависит от состава фосфолипидов клеточных мембран.

Еще одной группой токсинов, продуцируемых при вегетативном росте БТ, являются истинные *гемолизины*, способные образовывать поры в мембранах клеток. В частности, для БТ частично охарактеризован гемолизин HlyII, для которого описаны гемолитические свойства (Andreeva et al., 2006; Miles et al., 2006), а также способность индуцировать *in vivo* апоптоз моноцитов и макрофагов у позвоночных животных (Tran et al., 2011a,b).

Среди экзоферментов БТ с инсектицидной активностью следует отметить протеазы (Donovan et al., 1997; Okstad, 1999). Ранее считалось, что большинство секретируемых БТ протеаз, описанных как ArgA и NprA, вероятно, не вносят вклад в патогенез насекомых (Tan, Donovan, 2000). Однако было обнаружено, что БТ секретирует металлопротеазу, названную InA (Lovgren, 1990), которая может разрушать антимикробные белки насекомых аттацины и цекропины (Edlund et al., 1976; Dalhammar, Steiner, 1984), участвуя тем самым в патогенезе. Другая функция протеолитических ферментов, синтезируемых БТ, может заключаться в активации протоксина из дэльтатоксина (Честухина и др., 1978; Andrews et al., 1985; Rukmini, 2000).

Необходимо отметить, что некоторые штаммы БТ способны синтезировать *хитиназы*, представленные эндохитиназой и экзохитиназой (Kramer, Muthukrishnan, 1997; Sampson, Gooday, 1998). Существуют исследовательские работы, в которых показано, что данный фермент способен в определенных дозах проявлять патогенный эффект или усиливать действие токсинов (Smirnoff et al., 1973; Regev et al., 1996; Thamthiankul et al., 2001). Кроме того, предполагается, что наиболее вероятная роль хитиназ БТ может заключаться в частичном разрушении перитрофической мембраны насекомых, что позволяет бактериальному токсину легче пройти данный барьер (Sampson, Gooday, 1998).

Показано, что бактерии БТ имеют еще один класс инсектицидных белков, синтезируемых во время вегетативного роста, - *Vip белки*, которые проявляют активность против широкого спектра чешуекрылых и жесткокрылых насекомых. Следует отметить, что пока известны Vip1, Vip2 и Vip3 белки с молекулярной массой около 100, 52 и 88.5 кДа соответственно. При скармливании насекомым они вызывают паралич кишечника и лизис эпителиальных клеток кишечника (Estruch et al., 1996; Yu et al., 1997). Было показано, что Vip1 содержит β -домен, способный связываться с рецепторами на клеточных мембранах и формировать олигомеры, образующие канал, который помогает проникновению ферментативного домена токсина (Maagd et al., 2003).

У бактерий БТ описан ряд *бактериоцинов* и *антибиотиков*. Считается, что основная функция данных веществ связана с подавлением конкурентов в почве, а также в погибшем хозяине. Однако, их также следует рассматривать как факторы вирулентности бактерий БТ, так как они являются важными звеном во взаимодействии с другими микроорганизмами в кишечнике насекомых при бактериозе (Raymond et al., 2010). Антагонистическая активность бактерий отмечена у отдельных штаммов почти всех подвидов БТ (Иванов, 1981; Favret, Yousten, 1989). Активность бактериоцина – турицина, вероятно, связана с активностью фосфолипазы А (Favret, Yousten, 1989). Роль антибактериальных веществ бактерий в патогенезе насекомых до сих пор неизвестна. Не исключено, что подобные вещества оказывают существенное влияние на представителей микрофлоры кишечника. Соответственно, нарушение состава микрофлоры кишечника насекомых может привести к значительным дисфункциям кишечника насекомых и, как следствие, к усилению бактериальной инфекции (Raymond et al., 2012).

β -экзотоксин – термоустойчивый токсин нуклеотидной природы, выделяемый бактериальной клеткой в процессе жизнедеятельности в окружающую среду. Механизм действия токсина заключается в ингибировании синтеза ДНК-зависимой РНК - полимеразы, что приводит к нарушению синтеза

белков в организме насекомых. Кроме того, интоксикация β -эндотоксином может оказывать тератогенное действие, которое проявляется у взрослых насекомых с полным превращением. В комплексе со спорами и кристаллами экзотоксин действует как синергист (Лескова, Рыбина, 1987; Кандыбин, 1989). Благодаря нуклеотидной природе токсин действует на широкий круг насекомых различных отрядов (Ignoffo, Gregory, 1972; Herbert, Harper, 1985), а также на микроорганизмы (Барбашова, Владимирова, 1981) и млекопитающих (Beebe et al., 1972; Burges 1975). В связи с последним обстоятельством, штаммы БТ продуцирующие β -экзотоксин, запрещены для производства биопрепаратов на территории Евросоюза, хотя в России они широко используются для создания бактериальных препаратов, таких как Битоксибациллин и пр.

Важнейший вклад в развитие бактериального патогенеза БТ вносит параспоральный белковый кристалл, который синтезируется бактериями при споруляции. После завершения процесса споруляции, происходит лизис спорангия, в основном споры и кристаллы разъединяются, хотя для некоторых штаммов процесс разделения спор и кристаллов может не происходить, они остаются в спорангии. Ген, кодирующий кристаллический белок, впервые был выделен из *Bt ssp.kurstaki* и назван *cry* геном (Yamamoto, Dean, 2000). В дальнейшем была выделена и описана большая группа *Cry* генов, для которых была составлена информационная база (<http://www.btnomenclature.info/>). Кроме того, кристалл БТ может содержать *Cyt* токсины. Данные токсины высокоспецифичны к насекомым хозяевам и обладают литической активностью (de Maagd et al., 2003). Показано, что большинство генов *Cry* токсинов расположены в плазмидах бактериальных клеток БТ. В основу их классификации положен принцип идентичности аминокислотной последовательности *Cry*-белков, что отражается в степени их филогенетического родства (Crickmore et al., 1998). Из большого количества штаммов БТ клонировано около 200 генов кристаллических белков. Эти белки подразделяются на 8 отдельных классов, хотя,

как общее число белков, так и число классов продолжает увеличиваться, поскольку открываются новые белки (Crickmore, 2000).

Установлено, что кристалл может содержать один или несколько Cry токсинов. Классификация Cry белков основана на их строении и включает 70 подгрупп. Структура активированных трипсином Cry токсинов, таких как Cry1Aa (специфичных для *Lepidoptera*), Cry3Aa, Cry3Bb и Cry8Ea (специфичных для *Coleoptera*), Cry4Aa и Cry4Ba (специфичных для *Diptera*) и Cry2Aa (*Diptera-Lepidoptera* специфичных) была подробно описана в ряде работ (Hodgman, Ellar, 1990; Liet al., 1991; Grochulskiet al., 1995; Galitsky et al., 2001; Morse et al., 2001; Boonserm et al., 2005, 2006; Guo et al., 2009). Способность протоксинов кристаллизоваться снижает их чувствительность к ранней протеолитической деградации (Gill et al., 1992). Структура и растворимость кристаллов зависит от вторичной структуры протоксинов, силы дисульфидных связей и присутствия дополнительных компонентов бактерий БТ (Schnepf et al., 1998).

Ряд физиологических и биохимических исследований воздействия различных Cry токсинов на насекомых показывает следующий основной механизм их действия. Белковые кристаллы БТ растворяются до протоксинов в щелочной среде кишечника, при этом скорость растворения зависит от значения рН кишечного сока насекомых (Luthy, Wolfersberger, 2000). Полипептиды, которые высвобождаются после растворения кристалла, представляют собой протоксины, обладающие слабой биологической активностью. Для активации протоксинов в токсин необходим ограниченный протеолиз протеолитическими ферментами кишечника насекомых и бактериальными щелочными протеазами (Andrews et al., 1985; Tojo et al., 1986; Carroll et al., 1989). Далее, активированный токсин свободно проникает через перетрофическую мембрану, считается, что за счет небольшого молекулярного веса в 60-70 кДа (Luthy, Wolfersberger, 2000). Необходимо отметить, что связывание токсина с рецептором на поверхности эпителиальных клеток кишечника предшествует внедрению токсина в клеточную мембрану (Rie et al., 1989). Было показано, что токсины БТ в кишечнике

насекомых могут связываться с такими рецепторами, как заякоренные в мембране клеток гликозилированные белки аминопептидазы N и щелочные фосфатазы, а также кадгеринподобный рецептор и ADAM металлопротеиназа (Zhang, Lovgren, 1995). Вхождение токсина в апикальную мембрану цилиндрических клеток эпителия кишечника делает токсин неуязвимым к протеазам и создает поры или ионные каналы. Генерация двухсот таких пор в радиусе 0.5-1.0 нм в апикальной мембране столбчатых клеток приводит к очень быстрому нарушению мембранного потенциала, ионного и водного баланса, после чего клетка набухает и разрушается (Bravo et al., 1992). Эта модель действия токсина была названа моделью коллоидно-осмотического лизиса (Knowles, Ellar, 1987; Gazit et al., 1998; Pigott, Ellar, 2007). Обновленная модель коллоидно-осмотического лизиса предполагает последовательное взаимодействие токсинов, по крайней мере, с двумя видами рецепторов, что ускоряет внедрение олигомера в мембрану клеток кишечника (Knowles, Ellar; 1987; Bravo et al., 2005). Позднее Zhang предложил альтернативную модель действия токсинов, которая основана на предположении, что гибель клеток происходит не только за счет осмотического лизиса, но и за счет запуска Mg^{2+} - зависимого сигнального каскада с дестабилизацией цитоскелета клеток (Zhang et al., 2005). Одной из последних является интеграционная и гипотетическая модель действия, которая предполагает, что цитотоксичность токсинов осуществляется благодаря комбинации эффектов осмотического лизиса и внутриклеточной сигнализации с участием фосфатазы (Jurat-Fuentes et al., 2006).

Защитные механизмы насекомых могут быть связаны с различными этапами бактериальной инфекции БТ. В соответствии с механизмом действия бактерий: возможно неполное растворение кристалла эндотоксина, неправильное расщепление протоксина в результате ограниченного протеолиза, а также, при наличии дефекта в сайте связывания токсина, произойдет нарушение сборки олигомера токсина или формирования литических пор, усиление процессов клеточной репарации (Neckel, 1994). Кроме того, в последние годы активно

обсуждается участие реакций клеточного и гуморального иммунитета, а также антиоксидантной и детоксицирующей систем, как в конституционных, так и в индуцированных механизмах устойчивости насекомых к бактериям БТ (Dubovskiy et al., 2008; Ericsson et al., 2009; Wang et al., 2010; Ma et al., 2012). Следует отметить, что влияние на иммунную систему насекомых может происходить как напрямую - при проникновении бактерий в гемоцель насекомых, так и опосредованно. При возникновении дисфункции кишечника эпителиальные клетки, по всей вероятности, вырабатывают различные медиаторы, которые также воздействуют на иммунную систему насекомых. В результате, возможно, происходит активизация ключевых компонентов этой системы, что может предотвратить развитие вторичных инфекций.

1.2. Энтомопатогенные грибы *Metarhizium robertsii* и *Beauveria bassiana*

Энтомопатогенные грибы *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., Rehner & Humber и *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. относятся к семейству Clavicipitaceae s.s. (отдел *Ascomycota*, порядок *Hyphocreales*). Чаще всего они встречаются в экосистемах умеренного, тропического и экваториальных поясов, предпочитая лесные биоценозы, но также могут встречаться в агроценозах (Мюллер 1995; Огарков 1999; Огарков, Огаркова, 2000; Milner et al., 2002; Крюков и др., 2007; Wraight et al., 2007; Леднев и др., 2007; Vidal, Fargues, 2007; Meyling, Hajek 2010). Ранее гриб *M. robertsii* относили к грибам *M. anisopliae*, но в результате молекулярно-генетического анализа ДНК грибов его выделили в отдельный вид (Gao et al., 2011). Оптимальной для развития гриба *Metarhizium robertsii* является температура 28-30°C (Штейнхауз, 1952; Евлахова, 1974; Bidochka et al., 2001). *M. robertsii* поражает насекомых разных отрядов (Coleoptera, Hemiptera, Orthoptera, Leiodoptera, Hymenoptera, Diptera).

Изучение грибов рода *Beauveria* началось с работ А. Басси (1835), установившего грибную этиологию мускардиноза тутового шелкопряда. Возбудитель первоначально был отнесен к роду *Botrytis*, а впоследствии Р. Виллемен выделил его в отдельный род *Beauveria* (обзор: Павлюшин, 1979; Борисов и др., 2001). В настоящее время хорошо известно, что оптимальной для развития гриба *Beauveria bassiana* является температура 24-26°C. *Beauveria bassiana* поражает широкий круг насекомых-хозяев, вызывая болезнь под названием «белый мускардиноз». Хозяевами данного гриба могут выступать насекомые из отрядов *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Coleoptera*, *Diptera* и *Orthoptera* (Павлюшин, 1985; Лапа, Гораль, 1985; Акулинин, Василенко, 1993; Андреева, Штерншис, 1997; Гештовт, 2002; Lopez-Perez, 2014). Пораженные насекомые покрываются белым мучнистым или ватообразным мицелием. Заражению подвергаются насекомые почти на всех стадиях развития: — личинки, куколки, имаго, иногда яйца (Штейнхауз, 1952).

Жизненный цикл энтомопатогенных грибов *M. robertsii* и *B. bassiana* можно условно разделить на 3 основных стадии (Борисов и др., 2001).

1. Патогенная стадия. Эта стадия включает в себя прикрепление конидий к внешним покровам поражаемого насекомого, последующее проникновение в полость его тела с постепенной колонизацией его тканей и органов. Окончание этой стадии - смерть насекомого. После этого внутри насекомого формируется плотное сплетение гиф - склероций.

2. Некротрофная стадия. Началом этой стадии является обратный рост гиф через кутикулу погибшего хозяина, что приводит к формированию дочернего поколения конидий на поверхности погибшего насекомого.

3. Покоящаяся стадия. После завершения нектротрофной стадии конидии попадают во внешнюю среду. Они могут сохраняться в опавших листьях, почве, на различных частях растений. Во внешней среде грибы способны сохраняться достаточно длительное время, до следующего контакта с хозяином.

Заражение насекомых энтомопатогенными аскомицетами происходит различными путями. Проникновение грибов возможно через наружные покровы, поровые канальца в кутикуле, склериты, межсегментарные участки, кишечник, а также через дыхальца или анус (Вейзер, 1972; Глупов и др., 2001). Основным путем проникновения в насекомое для аскомицетов считается прорастание через кутикулу (Charnley, 2003; Charnley, Collins, 2007). Проникновение гриба через кутикулу можно условно разделить на несколько стадий: 1 – адгезия конидий гриба на поверхности насекомого, 2 – развитие гриба на поверхности кутикулы, 3 – проникновение и развитие гриба внутри кутикулы, 4 – проникновение в полость тела насекомого и колонизация его внутренних органов (Hajek, Stleger, 1994).

В самом начале происходит образование гидрофобных связей между кутикулярными липидами и клеточной оболочкой конидий гриба, в результате чего происходит закрепление спор (Goettel, 1988; Bogus et al., 2010). Также важную роль в закреплении патогена на поверхности насекомого играют микроворсинки, щетинки, неровности и выросты кутикулы (Hajek, Stleger, 1994). После удачного закрепления спор гриба происходит их развитие на поверхности покровов хозяев. На этом этапе большое влияние оказывает относительная влажность внешней среды, необходимая для прорастания споры и дальнейшего развития гриба. Спора прорастает ростковой трубкой, а в месте соприкосновения с кутикулой начинается образование апрессория (Hajek, St. Leger, 1994; Charnley, Collins, 2007). После этого апрессорий делится.

Для дальнейшего преодоления кутикулярных покровов энтомопатогенные грибы синтезируют протеазы, хитиназы и липазы (Gillespie et al., 1998; Yanhua Fan et al., 2007; Khachatourians, Qazi, 2008). Происходит активация липаз гриба и деградация кутикулярных белков под воздействием протеаз, в результате чего происходит высвобождение хитина, «маскируемого» белками экзокутикулы (Leal et al., 1997; Mohanty et al., 2008). Параллельно происходит индукция активности хитиназ гриба, которые гидролизуют хитин до N-ацетилглюкозамина. По мере роста гриба в насекомом, как правило, на кутикуле появляются темные

меланотические пятна, образующиеся в результате запуска в организме хозяина профенолоксидазного каскада. Пройдя кутикулярные слои и гиподерму, гриб прорастает в гемоцель насекомого. В гемоцеле происходит его дальнейшее развитие и колонизация внутренних органов, в гемолимфе образуются гифальные тела, бластоспоры гриба, разносящиеся с током гемолимфы по организму насекомого. В первую очередь гриб поражает жировое тело, затем кишечник, мальпигиевы сосуды, гиподерму, нервную систему, мышечную ткань, трахеи. Через некоторое время грибные гифы начинают расти в обратном направлении, к поверхности тела хозяина. Затем гифы прорывают кутикулярные покровы и выходят на поверхность (Глулов и др., 2001).

Огромный вклад в развитие патогенеза, вызываемого энтомопатогенными грибами вносят токсины, вырабатываемые грибами. Наиболее хорошо изучены и описаны токсины грибов *Beauveria*, *Metarhizium*, *Aspergillus*, *Penicillium* (Pedras et al., 2002; Pava-Ripoll et al., 2008; Wang et al., 2010; Крюков и др., 2012). Гриб *B. bassiana* продуцирует ряд вторичных метаболитов, в частности, бассианин, бассиакридин, бассианолид, боверолиды, тенеллин и ооспореин. Некоторые из них обладают токсичным действием по отношению к клеткам насекомых (бассианин, бассиакридин, бассианолид, боверолиды, тенеллин), а некоторые антибиотическим и антигрибковым действием (ооспореин) (Roy et al., 2008). Наиболее изучаемыми токсинами в настоящее время являются деструксины - токсины, впервые выделенные из грибов рода *Metarhizium*. В настоящее время насчитывается около 38 типов деструксинов или их аналогов (James et al., 1993; Amiri-Besheli et al., 2000; Roberts, St. Leger, 2004; Hu et al., 2006). Деструксины (A, B, E) обладают выраженным инсектицидным действием (Huxham et al., 1989a; Cavelier et al., 1998; Thomsen и Eilenberg, 2000). У насекомых при инъекциях деструксинов возникает паралич или тремор (Samuels et al., 1988; Bradfish, Harmer, 1990). Кроме того, деструксины обладают иммуносупрессивным действием за счет нарушения функций цитоскелета гемоцитов и, как следствие,

подавления процессов клеточного иммунитета (Vilcinskas et al., 1997a; Kershaw et al., 1999).

1.3. Механизмы резистентности насекомых к бактериальным и грибным инфекциям

Понятие «Резистентность» охватывает более широкий круг явлений, чем иммунитет. В биологической литературе его применяют для характеристики устойчивости организма к каким-либо внешним или внутренним воздействиям. Чтобы предотвратить возникновение заболевания или справиться с его последствиями, у насекомых в течение эволюции сформировались защитные механизмы различного плана: этологические, экологические, морфофизиологические, биохимические и молекулярные.

В данном разделе будут рассмотрены морфологические, физиолого-биохимические и молекулярные защитные механизмы насекомых, определяющие устойчивость насекомых к бактериям и грибам.

1.3.1. Внешние системы защиты насекомых

1.3.1.1. Покровы

Особенности покровов насекомых, позволяющие противостоять патогенам, в частности грибной природы, в значительной степени определяются свойствами и составом верхних слоев кутикулы (эпикутикулы), толщиной хитинового слоя, степенью склеротизации прокутикулы, а также интенсивностью меланизации (Klowden, 1997; Wilson et al., 2001). Кроме того, необходимо отметить способность эпителиальных клеток кутикулы продуцировать антимикробные белки, пептиды, и компоненты профенолоксидаз-активирующего комплекса,

которые воздействуют на патогенов, непосредственно в кутикуле (Brey et al., 1993). Кутикула насекомых является существенным барьером, как для бактерий, так и грибов. Однако, при нарушении ее целостности вследствие механического повреждения, через поврежденные участки микроорганизмы могут практически беспрепятственно попадать в гемоцель. Следует отметить, что при контаминации яйцекладов самок паразитоидов или мандибул хищников бактериями и грибами, также возможен перенос микроорганизмов и быстрое инфицирование насекомых хозяев (Flanders, Hall, 1956; Damgaard, 2000).

Покровы насекомых состоят из нескольких слоев. На базальной мембране находится слой эпидермальных клеток, к которым примыкает кутикула. Кутикула состоит из нескольких слоев: эндокутикулы, экзокутикулы и эпикутикулы.

Базальная мембрана имеет неклеточное строение. Это аморфный гранулярный слой, состоящий из мукополисахаридов, отделяющий гиподерму от полости тела. Гиподерма представлена непрерывным однослойным рядом одно- или многоядерных клеток. Некоторые специализированные клетки гиподермы образуют волоски и сенсиллы, различные железы (Шванвич, 1949; Nation, 2008). Во многих клетках гиподермы содержатся гранулы пигментов, способные перемещаться и тем самым обуславливающие изменения окраски насекомых. Клетки гиподермы выполняют функции, связанные с синтезом различных биологически активных веществ, участвующих в процессах растворения и формирования кутикулярных слоев во время линьки, также функции заживления ран (при повреждении гиподермы происходит ее восстановление путем миграции и размножения гиподермальных клеток) (Тыщенко, 1986; Nation, 2008).

В кутикуле выделяют внутренний слой – *прокутикулу*, содержащую высокомолекулярный полисахарид хитин (полимер N-ацетил-d-глюкозамин). Прокутикула проницаема для воды и выполняет в основном функцию механической защиты тканей насекомого. В свою очередь, прокутикула состоит из *эндокутикулы*, в которой полимерные молекулы хитина связаны с белками и образуют чередующиеся слои, составленные из пластинок-ламелл и

экзокутикулы, в которой хитиново-протеиновые молекулы склеротизированы и присутствуют пигменты (Тыщенко, 1986; Gullan, Cranston, 2010). В результате процессов склеротизации и пигментации кутикулы насекомых она становится более прочной и приобретает определенный цвет. В течение данного процесса происходит образование поперечных связей между смежными цепями полипептида. Данное поперечное соединение происходит в результате окислительных и нуклеофильных реакций между высокоактивными агентами склеротизации, полученными из катехолов и нуклеофильных групп белков (Hopkins, Kramer, 1992; Kramer et al., 2001). Окисление катехолов катализируется фенолоксидазой, это важный фермент участвующий не только в склеротизации, но также в иммунных реакциях насекомых. Через прокутикулу проходят поровые каналы, которые обеспечивают секрецию различных веществ при линьке, а также веществ участвующих в восстановлении поврежденных покровов и синтезе кутикулярных восков (Gullan, Cranston, 2010). Внешний слой кутикулы называется *эпикутикула*, в свою очередь он делится на внутренний *протеиновый слой*, верхняя часть этого слоя образована задубленным хиноном липопротеиновым комплексом - кутикулином (этот слой проницаем для воды и восков, но не проницаем для экзувиальной жидкости). В протеиновом слое кроме белков содержатся полифенолы, дифенолы, участвующие в склеротизации, задубливании и окрашивании покровных тканей насекомых. Над этим слоем расположен *восковой слой*, состоящий из липидных соединений (жирные кислоты их эфиры), длинноцепочечных углеводов и диоловых спиртов (воска формируются на поверхности покровов из жирных кислот и спиртов, поступающих по каналам из эпидермиса). Данный слой играет важную роль, препятствуя потерям воды из организма. Однако первичнобескрылые насекомые зачастую не имеют эпикутикулы, также она не развита у личинок насекомых, полностью перешедших к жизни в водной среде (хириноиды) (Тыщенко, 1986).

Уровень резистентности насекомого к грибам нередко зависит от толщины хитинового слоя и степени склеротизации прокутикулы. Известно, что насекомые

с мощной и склеротизированной кутикулой менее восприимчивы к энтомопатогенным грибам (Bogus et al., 2007; Hassan, Charnley, 1989). Восприимчивость к патогенам насекомых зависит от фазы и возраста. Известно, что имаго многих насекомых гораздо более устойчивы к грибам, чем личинки, а устойчивость личинок к грибам возрастает по мере их роста. Старшие возраста, как правило, менее восприимчивы, чем младшие (James et al., 2003). Известно, что непосредственно после линьки насекомые наиболее восприимчивы к энтомопатогенным грибам в силу того, что процессы склеротизации находятся на начальном этапе.

Резистентность насекомых к патогенам в значительной степени определяют свойства верхних слоев кутикулы (эпикутикулы). Это связано с тем, что на первых этапах проникновения гриба в насекомое необходима адгезия конидий на ее поверхности. Споры гриба фиксируются на поверхности кутикулы за счет гидрофобных взаимодействий и начинают прорастать (Борисов и др., 2001). При этом существует ряд ограничений для энтомопатогенов, в частности, микроорганизмы должны быть способны утилизировать скудные питательные вещества, быть невосприимчивыми к ряду метаболитов поверхностной флоры и определенным соединениям, входящих в состав эпикутикулы. Так, было установлено, что в зависимости от состава и концентрации, жирные кислоты наружных покровов могут как увеличивать восприимчивость к грибу, так и снижать (Smith, Grula, 1982; James et al., 2003).

В кутикуле при повреждении или при проникновении через нее патогена происходит кутикулярная меланизация, опосредованная деятельностью фенолоксидаз-активирующего каскада. Меланин и продукты, которые образуются в процессе ферментативных реакций, способны предотвратить дальнейший рост микроорганизмов (St. Leger et al. 1988; Hajek, St. Leger, 1994). Ряд авторов показывают корреляцию устойчивости насекомых к патогенам и интенсивностью меланизации кутикулы насекомых (Wilson et al., 2001). Как правило, данные работы проводились на насекомых, которые при большом скоплении

(скученности) приобретают более темную окраску в отличие от одиночных особей. Так личинки *Spodoptera exempta* и *Mythimna separate*, имеющие темную окраску, более устойчивы к вирусу ядерного полиэдроза, нежели светлые (Kunimi, Yamada, 1990; Reeson et al. 1998). Сходная устойчивость была обнаружена у личинок *Mythimna separate* (Mitsui, Kunimi, 1988) и *Tenebrio molitor* (Barnes et al., 2000) по отношению к энтомопатогенным грибам.

Насекомое постоянно сталкивается с сопутствующей микрофлорой, при этом при повреждении кутикулы различные микроорганизмы могут преодолевать твердые слои кутикулы. Следует отметить, что ряд авторов выявил антибактериальную (цикропин-подобную) активность в эпителиальных клетках (Brey и др., 1993). В случае с энтомопатогенными грибами, когда их рост внутри кутикулы может быть замедлен за счет вышеперечисленных защитных соединений хозяина, насекомое может избавиться от гриба за счет линьки. Вполне закономерно, что при линьке, насекомые могут освобождаться и от спор гриба, находящихся на кутикуле (Борисов и др., 2001).

1.3.1.2. Кишечник

Значительным барьером на пути проникновения патогенов и паразитов является хитиновая интима, которой выстланы передний и задний отделы кишечника насекомых. Поэтому большое количество патогенов проникает в гемоцель насекомых через средний кишечник (Глулов и др., 2001). Однако, аналогично гликокаликсному слою на поверхности эпителиальных клеток позвоночных, средний отдел кишечника насекомых имеет перитрофическую мембрану (матрикс) (ПМ), которая состоит из белков, гликопротеинов и хитиновых микрофибрилл, погруженных в протеогликановый матрикс. Благодаря такому составу, ПМ может защищать эпителиальные клетки от механических повреждений и инфекционных агентов. Кроме того, было показано участие ПМ в

антиоксидантной защите эпителиальных клеток кишечника и детоксикации различных ксенобиотиков (Bernays, Chamberlain, 1980).

Кроме ПМ, для инактивации как эндогенных, так и экзогенных токсичных метаболитов и различных ксенобиотиков, в кишечнике насекомых существуют биохимические системы, такие как антиоксидантная и детоксицирующая системы (Nappi et al., 2000; Зенков и др., 2001). Подробнее роль этих систем защиты будет рассмотрена в главе об антиоксидантной и детоксицирующей системе насекомых.

Пищеварительные ферменты способны разрушать клетки и метаболиты бактерий. В частности, при растворении кристалла БТ под действием рН кишечного сока возможно неполное высвобождение Cry-протоксинов. Однако, кислотность кишечника – это довольно консервативный видовой признак у насекомых. Практически не существует исследований, показывающих, что устойчивость насекомых к БТ вызвана изменением кислотности кишечника. Однако, изменение рН кишечника может происходить при смене пищевого рациона насекомых, например у монофагов, при питании неспецифическим кормом в условиях высокой конкуренции за пищевые ресурсы или при смене мест обитания (Yamvriyas, 1962).

Ограниченный протеолиз протоксинов БТ является одним из ключевых этапов активации Cry-токсинов. Следовательно, изменение состава протеаз, повышение или снижение их активности в кишечнике, может приводить к чрезмерному или недостаточному расщеплению протоксина, соответственно, не будет происходить активации токсина. Подобные изменения в активировании токсина показаны в исследовательских работах на примере личинок амбарной огневки *Plodia interpunctella* и хлопковой совки *Heliothis virescens*, устойчивых к бактериям БТ (Oppert et al., 1994; Forcada et al., 1996, 1999). Кроме того, считается, что снижение протеазной активности в кишечнике устойчивых к БТ насекомых может приводить к снижению репродуктивного успеха у таких насекомых (Rahman et al., 2011). Следует отметить, что вторичные метаболиты растений, в первую очередь фенолы, могут ингибировать активность

пищеварительных ферментов насекомых, что может также сопровождаться нарушением активации токсина БТ (Feeny, 1976; Martin et al., 1987, Felton, Gatehouse, 1996). В таком случае возникает своеобразный парадокс, с одной стороны фенолы оказывают негативное влияние на пищеварительную систему насекомого, с другой могут защитить от Сгу-токсинов БТ.

Одним из важнейших факторов, определяющих устойчивость насекомых к бактериям БТ, является модификация рецепторов связывания для активированного токсина на поверхности эпителиальных клеток кишечника. Первое сообщение о возникновении такого типа устойчивости было сделано в 1990 году при изучении механизмов резистентности амбарной огневки *P. interpunctella*, селектированной на устойчивость к Сгу1Ab токсину (Rie et al., 1990). Позже было установлено, что такой тип устойчивости к токсинам БТ, связанный с дефектом сайта связывания токсина, является весьма распространенным среди насекомых отряда чешуекрылые (Lee et al., 1995; Tabashnik et al., 1997; Gonzalez-Cabrera et al., 2003). В частности, было показано, что изменения N-аминопептидазы и кадеринподобного рецептора приводят к формированию устойчивых к токсинам БТ насекомых (Rajagopal et al., 2002; Morin et al., 2003). Причем устойчивость насекомых в случае использования одного Сгу-токсина при селекции в лаборатории или на трансгенных растениях (содержащих сгу-гены) в полевых условиях возникала достаточно быстро - за несколько поколений (Ferre, Van Rie, 2002).

Ранее считалось, что «кишечный иммунитет» насекомых к большинству грамположительных бактерий определяется наличием в кишечном тракте лизоцима, который разрушает чувствительные к нему бактерии (Мориг, Месснер, 1969; Полтев и др., 1969). Однако позднее было показано, что лизоцим способен повреждать не только грамположительные, но и грамотрицательные бактерии (Zdybicka-Varabas, 2012). Кроме того, недавние исследования показывают, что эпителиальные клетки кишечника насекомых могут продуцировать не только лизоцим, но также и ряд других антимикробных пептидов, активных против

бактериальных и грибных микроорганизмов (Wojda, Jakubowicz, 2007; Mak et al., 2010). В случае с БТ, которые достаточно устойчивы к АМБ, может наблюдаться ситуация, когда АМБ будут оказывать большее влияние на микрофлору в кишечнике чем на БТ. На повышенном фоне АМБ насекомые будут способны перенести низкие дозы БТ за счет репарационных и регенерационных процессов. Существуют единичные работы, в которых показано, что при инфицировании насекомых низкими дозами бактерий происходит активизация процессов репарации эпителиальных клеток кишечника (Buchon et al., 2009). В ряде исследований отмечено, что такой механизм устойчивости может быть эффективен при низком уровне инфекционной нагрузки (Hernández-Martínez et al., 2010). Не исключено, что модуляторами репарационных процессов могут выступать компоненты разрушенных бактерий (ЛПС, гликаны и т.п.) (Tsakas, Marmaras, 2010).

Необходимо также отметить, что на развитие патогенов в кишечнике насекомых большое влияние оказывает кишечная флора (Raymond et al., 2010). В исследовательских работах показано, что представители микрофлоры могут непосредственно оказывать антагонистическое действие, например, на энтомопатогенные грибы (Полтев и др., 1969), или косвенно, синтезируя протеолитические ферменты, способные разрушать токсины бактерий БТ (Глулов и др., 2001). Также существует гипотеза, что на первых этапах развития кишечной бактериальной инфекции БТ у личинок чешуекрылых основной вклад в развитие септицемии вносит микрофлора кишечника, которая может быстро размножаться, попадая в гемоцель насекомого через повреждения в ткани кишечника, образованные токсином БТ (Broderick et al., 2010). Однако существуют исследования, опровергающие данную гипотезу и показывающие, что повышенная устойчивость насекомых к бактериям БТ, связана с необычайно высоким количеством микрофлоры кишечника (Hernández-Martínez, 2010). Также, сообщается о синергизме в патогенезе между бактериями БТ и *Bacillus cereus*, основанном на подавлении микрофлоры пищеварительного тракта (Raymond et

al., 2010). Возможно, все зависит от качественного состава микрофлоры и характера взаимодействия этой флоры с БТ в каждом отдельном случае.

Таким образом, кишечник является существенным барьером на пути проникновения инфекции, благодаря особенностям состава и строения его отделов. Также, в кишечнике насекомых может происходить подавление инфекции БТ за счет синтеза различных соединений (АКМ, антибактериальные и фунгицидные белки, ферменты), обладающих антимикробными свойствами. Особая роль принадлежит перитрофической мембране и компонентам антиоксидантной и детоксицирующей систем, которые осуществляют инактивацию и детоксикацию токсинов как экзогенного, так и эндогенного происхождения.

1.3.2. Реакции клеточного и гуморального иммунитета

При преодолении патогеном внешних барьеров хозяина активизируются гуморальный и клеточный иммунный ответ насекомых. Первичный иммунный ответ насекомых на инфекцию заключается в распознавании чужеродных агентов, что приводит к активации процессов фагоцитоза, реакции коагуляции, профенолоксидазного каскада и последующей меланизации и инкапсуляции, а также к синтезу антимикробных белков (Jiang, Kanost, 1997).

1.3.2.1. Клеточные иммунные реакции

В формировании клеточного иммунного ответа насекомых участвуют клетки кроветворной ткани, перикардальные клетки, а также фиксированные и свободноциркулирующие клетки гемолимфы – гемоциты (Hoffmann, 1995; Strand et al., 1996; Strand, 2008). Известно, что гемоциты участвуют в различных

процессах жизнедеятельности организма: в метаморфозе, синтезе ряда ферментов, дифференцировке тканей и т.д., однако они также выполняют ключевую роль в иммунном ответе насекомых, отвечая за реакции фагоцитоза, инкапсуляции и гранулообразования.

Классификация гемоцитов

У насекомых имеются несколько типов гемоцитов, их классификация построена на основе морфологических, гистохимических и функциональных характеристик (Gupta, 1985; Brehelin, Zachary, 1986). Позже для идентификации гемоцитов начали использовать антитела и генетические маркеры (Chain et al., 1992; Willott et al., 1994; Johnson, 1996; Gardiner, 1999; Lebestky et al., 2000). Однако в зависимости от вида насекомого, стадии его развития идентификация гемоцитов может быть несколько затруднена. При этом ряд авторов выделяет разное количество типов гемоцитов, но есть 5 общих типов, описанных в литературе: *прогемоциты* – полипотентные клетки гемолимфы, наибольшее содержание которых наблюдается у личинок младших возрастов, а у имаго они могут либо отсутствовать, либо содержаться в небольшом количестве; *гранулоциты* - содержат большое количество включений, участвуют в процессах фагоцитоза и инкапсуляции; *плазматоциты* – клетки, представленные в большом количестве в гемолимфе, имеют небольшое число гранул, также участвуют в процессах фагоцитоза и инкапсуляции; *сферулоциты* и *эноцитойды* – содержащие во внутриклеточном пространстве гранулированные включения (Ahmad, 1988; Azambuja et al., 1991; Ahmad, 1992; Luckhart et al., 1992; Fenoglio et al., 1993; Sonawane, 1993; Joshi, Lambdin, 1996; Hernandez et al., 1999).

Фагоцитоз

Фагоцитоз является одной из первых защитных реакций организма, которая активизируется в ответ на проникновение чужеродного объекта. У насекомых в фагоцитозе могут участвовать фиксированные перикардальные клетки, клетки кроветворной ткани, два типа клеток гемолимфы (гранулоциты и плазматоциты) и

некоторые клетки жирового тела (Jones et al., 1996; Глупов и др., 2001). Процесс фагоцитоза, как у простейших, так и у высокоорганизованных животных, в частности – насекомых, развивается по единой схеме и может быть разделен на четыре стадии: (1) хемотаксис и распознавание чужеродного материала, (2) адгезия гемоцитов к проникшим в гемоцель чужеродным объектам, (3) поглощение чужеродного материала и образование пищеварительной вакуоли (фагосомы), (4) разрушение, либо изоляция инородного тела (Lavine, Strand, 2002). Фагоцитоз может идти по нескольким путям: формирование пиноцитозных пузырьков при поглощении жидкостей или вирусов; обволакивание частиц с помощью псевдоподий (зипер-модель); наплзание плазматической мембраны на инородное тело (триггер-модель) (Lavine, Strand, 2002).

К настоящему времени предполагается, что активация фагоцитоза происходит при связывании паттерн-распознающих рецепторов на поверхности фагоцитирующей клетки с компонентами клеточных стенок патогенов (β -1,3 гликан, гликопротеины, липополисахариды и пептидогликаны) (Tsakas, Marmaras, 2010). К паттерн-распознающим рецепторам относят иммуноглобулин-подобные белки, интегрины, коллагены, пероксинектины и ламинины, агглютинины и т.д. (Gunnarsson, 1988; Yeung et al., 2006; Zaidman-Re'my et al., 2011; Rosales, 2011). Необходимо отметить, что зачастую паттерн-распознающие белки связаны с системой активации профенолоксидазного каскада. До недавнего времени отрицалось участие активированных кислородных метаболитов (АКМ) в процессах фагоцитоза у беспозвоночных. Тем не менее, новейшие исследования показали, что у ряда представителей отрядов *Coleoptera*, *Lepidoptera* и *Odonoptera* клеточные иммунные реакции сопровождаются образованием АКМ, а также высокорепактивных соединений азота, которые могут участвовать в разрушении инородного материала (Глупов и др., 2001; Lavine, Strand, 2002).

Инкапсуляция и капсулообразование

Реакции капсуло- и гранулообразования позволяют изолировать крупные объекты, превышающие размеры самих гемоцитов (многоклеточные паразиты,

паразитоиды и т.д.). Следует отметить, что механизм формирования капсулы и гранул аналогичен и развивается в две физиологические фазы (Strand, Pech, 1995; Lavine, Strand, 2002). В первую фазу происходит распластывание гранулоцитов на поверхности инородного тела, при этом происходит частичное или полное разрушение клеток и дегрануляция, т.е. выброс содержимого гемоцитов в окружающее пространство, а именно коагулогена, лизоцима, компонентов профенолоксидазной системы и белков, стимулирующих распластывание плазматоцитов. После дегрануляции гемоцитов инородное тело окружается распластанными плазматоцитами, а внутренняя оболочка меланизируется. Объединение гемоцитов в гладкую капсулу, прикрепившуюся к тканям хозяина, составляет вторую фазу инкапсуляции. В окончательно сформированной капсуле в центре находится проникший в гемоцель объект, покрытый слоем, состоящим из разрушенных клеток крови, эумеланина, склеротина и белков. Средний слой состоит из сильноуплощенных и частично разрушенных гемоцитов, а внешний слой состоит из свободно прикрепленных клеток крови (Lavine, Strand, 2002). В зависимости от вида насекомого, а также свойств чужеродного объекта, капсула может быть образована в течение 2-х – 24-х часов, но только через 72 часа ее можно считать полностью завершенной. Процесс гранулообразования схож с процессом инкапсуляции, но имеет ряд особенностей. В частности, процесс образования гранулы состоит из формирования многоклеточных клампов гемоцитов, которые вовлекают большое количество бактерий или других чужеродных агентов. Гранулообразование начинается, когда количество бактерий превышает определенный уровень и гемоциты не в состоянии их всех фагоцитировать. Тогда гемоциты вместе с бактериями формируют конгломераты, которые увеличиваются, за счет присоединения других гемоцитов. В некоторых случаях, но не всегда, образованные гранулы меланизируются. Эти покрытые меланином гранулы - эффективный способ изолировать бактерии. Процесс формирования гранул до конца не охарактеризован, но есть работы, в которых показана роль эйкозаноидов в этом процессе у различных видов насекомых (Miller et al., 1999; Shrestha et al., 2009; Zhao et al., 2009; Shrestha et al., 2010), а

также участие в этом процессе прфенолоксидазы (проФО), а также дофадекарбоксилазы (Sideri et al., 2008). Кроме того, при исследовании генов, вовлеченных в иммунный ответ было идентифицировано два белковых медиатора, Noduler (Gandhe et al., 2007) и Reeler1 (Bao et al., 2011) участвующих в гранулообразовании при инъекциях бактерий *E. coli* и *B. subtilis*. В основном, капсулы и гранулы выполняют функции механического барьера, изолируя патоген от организма насекомого, ограничивая его рост и развитие. Но кроме этого, меланин и промежуточные продукты его синтеза (АКМ и др.) способны оказывать токсическое действие на паразита (Глушов и др., 2001).

Как показывает ряд авторов, энтомопатогенные аскомицеты, проникшие в гемоцель насекомого хозяина и подвергшиеся защитным реакциям клеточного иммунитета, способны выживать внутри образовавшихся меланотических капсул. Так Бидочка и др (2010) предположили, что способность грибов выживать внутри капсулы связана с их приспособленностью к выживанию в почве. В большинстве исследований зафиксировано снижение показателей клеточного иммунитета при микозах. Ряд авторов приходят к выводу, что подавление процессов фагоцитоза и гранулообразования происходит за счет грибных метаболитов, как при введении чистых грибных токсинов (Bandani, 2008), так и непосредственно при развитии грибной инфекции (Vilcinskis, 1997), однако стоит отметить, что компоненты грибковой клеточной стенки могут стимулировать фагоцитоз (Gunnarson, 1988).

В настоящее время участие реакций клеточного иммунитета при микозах достаточно хорошо изучено. Установлено, что инкапсуляция является одним из важнейших процессов инактивации гриба в гемоцеле, а гемоциты способны фагоцитировать грибные бластоспоры (Hajek, Stleger, 1994). Однако, практически не известен вклад данных систем при эволюции резистентности к грибу. Исследования реакций клеточного иммунитета при бактериозах БТ носят спорадический характер (Ericsson et al., 2009).

1.3.2.2. Гуморальные иммунные реакции

Профенолоксидазная система

Важную роль в защитных механизмах насекомых играет фенолоксидаза (ФО), это медьсодержащий фермент из класса оксиредуктаз, окисляющий фенольные соединения. У насекомых ФО локализованы в гемолимфе и кутикуле. В организме насекомых ФО содержится в виде инактивированных проферментов (проФО), активация которых происходит при ограниченном протеолизе (Глулов и др., 2001). Профенолоксидаза насекомых имеет молекулярную массу приблизительно 80 kDa и содержит приблизительно 685 аминокислот (Hall et al., 1995; Fujimoto et al., 1995). Активация ФО в организме насекомых происходит при помощи ферментативного каскада, который также называется профенолоксидазный каскад. При этом запуск данного каскада происходит в ответ на определенные факторы, в том числе на проникновение и развитие патогена (Hung, Boucias, 1996; Meister et al., 2000). Данные факторы могут активировать сериновые протеазы, осуществляющие ограниченный протеолиз профенолоксидаз. Установлено, что активация профенолоксидазного каскада может происходить при взаимодействии с составляющими клеточных стенок микроорганизмов. Активированная ФО принимает участие в образовании меланина (Cerenius, Soderhall, 2004). В беспозвоночных, кроме обеспечения пигментации, меланин также вовлечен в три физиологически важных процесса: иммунные реакции, заживление ран и кутикулярная склеротизация. Важными защитными реакциями на пути развития патогенов, в частности грибов, у насекомых служит меланизация и инкапсуляция. Эти процессы не только ограничивают повреждения кутикулы, вызванные патогеном, но также предотвращают рост и распространение болезнетворного микроорганизма. Кроме того, в ряде работ установлены антибактериальные и фунгицидные свойства меланина (Soderhall, Ajaxon, 1982). Быстрая меланизация раны происходит при механическом повреждении тела насекомого, что предотвращает потерю гемолимфы. На участке повреждения наблюдается активация ФО и образование меланина, все это происходит в комбинации с механизмом коагуляции, что

позволяет «запечатать» рану (Sugumaran, 1998, 2010). Кроме того, ряд метаболитов, являющихся промежуточными звеньями меланотического каскада (АКМ, гидрохиноны и т.д.), обладают цитотоксичностью и могут уничтожать болезнетворные микроорганизмы (Nappi, 1993; Komarov et al., 2009).

Образование меланина начинается с гидроксирования тирозина в дигидрооксифенилаланин (ДОФА) под действием ФО, в дальнейшем происходит окисление ДОФА до ДОФА-хинона также с участием ФО. Дальнейшее образование меланина включает внутримоллекулярную циклизацию и индолизацию ДОФА-хинона в формы лейко-ДОФА-хрома, ДОФА-хрома, 5,6-дигидрооксииндола и индолил-5,6-хинона, а также эумеланин. Из ДОФА-хрома в присутствии ионов металлов (двухвалентных) образуется 5,6-дигидрооксииндол-2-уксусная кислота. В дальнейшем под действием пероксидаз и ФО индолы окисляются до хинонов с последующей полимеризацией и образованием эумеланина. Также в данном каскаде под действием дофадекарбоксилазы из ДОФА может образовываться дофамин, который является предшественником дигидрооксииндола и эумеланина. Дофамин может ацетилироваться (N-ацетилтрансферазой), в результате образуется N-ацетилдофамин, переходящий в N-ацетилдофаминхинон, который полимеризуется с образованием склеротина (Глупов и др., 2001; Глупов и др., 2009).

Промежуточные звенья профенолоксидазного каскада являются токсичными и могут быть опасны для самого насекомого, в связи с этим существует необходимость контроля над активацией и деятельностью ФО. Этот контроль частично достигнут за счет того, что ФО находится в организме насекомых как профермент. Кроме того необходимо контролировать чрезмерную активацию ФО, при этом важную роль играют ингибиторы протеиназ (Cerenius, Soderhall, 2004). Одними из первых ингибиторов проФО активирующих ферментов были описаны белки из пресноводного речного рака (Liang, 1997). В этих животных самый эффективный ингибитор был гетеродимерный белок - 155-kDa (Liang, 1997). Поскольку ингибиторы выделенные из речного рака были первыми из описанных,

то они теперь обычно упоминаются как члены «*pacifastin*» семьи ингибиторов протеиназы (Cerenius, Soderhall, 2004). В насекомых *M. sexta* (Jiang, Kanost, 1997), *H. cunea* (Park, 2000) и других (Gregorio et al., 2002) были описаны ингибиторы, не принадлежащие к вышеупомянутой семье.

Действие паразитов и патогенов на профенолоксидазный каскад может быть различным. Так паразитоиды зачастую подавляют иммунитет насекомых, снижая активность ФО. Некоторые паразитоиды подавляют ФО посредством симбиотных вирусов (Asgar, 2003). Также показано действие грибных деструксинов, которые предотвращали производство ФО клетками гемолимфы саранчовых (Nuxham et al., 1989), вероятно, разрушая клетки, которые производят профенолоксидазу (Cerenius et al., 1990). В работе Гилеспие с соавторами (Gillespie, 2000) на саранчовых показано уменьшение уровня ФО в насекомых при микозах, вызванных *Metarhizium anisopliae*. При этом в других работах было показано увеличение активности ФО в гемолимфе *S. exigua* (Boucias, 1996) под действием *B. bassiana*. Активность ФО при кишечных бактериозах изучена очень слабо, но есть свидетельства участия данного фермента в защитных реакциях против бактерий БТ (Rahman et al., 2004). Вероятно, влияние паразитов на активность ФО зависит от вида патогена, его характеристик, количества инфекционного начала и множества других факторов.

Коагуляция

При нарушении целостности внутренних органов или кутикулы в организме насекомых запускается процесс коагуляции, который «запечатывает рану», предотвращает дальнейшую потерю гемолимфы, а также ограничивает проникновение микроорганизмов (Gupta, 1991; Iwanaga et al., 1994; Theopolda et al., 2002). В процесс коагуляции у членистоногих вовлечены три сериновые протеазы (проформы) и коагулирующий белок коагулоген, который преобразуется в коагулин, а также клеточные компоненты – гранулоциты (Muta, Iwanaga, 1996; Gupta, 2001). Насекомые имеют два вида коагулогенов: гемоцитин, содержащийся в гранулах гранулоцитов, и плазменный, синтезируемый жировым телом

(липофорины) (Bohn, 1986). Гемоцитный и плазменный коагулогены формируют перекрестно связанный сгусток. В свою очередь, для данного процесса необходимо наличие ионов кальция и активного Н-фактора, секретируемого гемоцитами (Theopold, 2002; Lavine, Strand, 2002).

Антибактериальная система

Синтез антимикробных белков (АМБ) происходит постоянно в организме насекомых, вне зависимости от наличия каких-либо воздействий со стороны, но на низком уровне, однако некоторые пептиды вообще не синтезируются без присутствия патогенов. При ранении и проникновении энтомопатогенов происходит индукция синтеза АМБ в различных тканях и органах насекомых (Hancock, Sahl, 2006). Показано, что антибактериальные белки синтезируются системно гемоцитами, иногда перикардальными клетками насекомых, и жировым телом. Следует отметить, что на долю жирового тела приходится основная масса индуцибельных пептидов (Yang et al., 2011). После синтеза в жировом теле АМБ секретируются в гемолимфу насекомых (Gillespie, Kanost, 1997). Кроме того, синтез антимикробных пептидов осуществляется локально, в местах возможного проникновения патогенов - эпителиальных клетках кутикулы, среднего кишечника, трахей насекомых (Broderick et al., 2009). Необходимо отметить специфичность синтеза АМБ в ответ на энтомопатогены различной природы. Инъекцирование насекомых гифомицетами может приводить к увеличению фунгицидной активности, но не антибактериальной, в то время, как заражение бактериями может вызывать системный синтез всех изучаемых АМБ (Wojda et al., 2009; Mak et al., 2010).

Как правило, каждый вид насекомых производит уникальный набор АМБ, для которых характерна специфичность, направленная на широкую группу микроорганизмов (грамположительные (Гр⁺), грамотрицательные (Гр⁻) бактерии, грибы). Кроме того, одновременное присутствие нескольких, совместно действующих, АМБ обеспечивает более полную защиту от патогенных микроорганизмов (Bulet et al., 1999).

В настоящее время установлено большое количество АМБ. В рассматриваемом обзоре мы не будем останавливаться на всех группах АМБ, а рассмотрим лишь те, которые синтезируются у личинок большой воцинной огневки – основного объекта наших исследований. У *Galleria mellonella* изучено 18 антимикробных белков и пептидов (Cytrynska et al., 2007; Brown et al., 2009).

Лизоцим (фермент мурамидаза) синтезируется постоянно клетками жирового тела, однако при инфицировании насекомых происходит индукция его синтеза. Лизоцим гидролизует гликозидную связь между N- ацетилглюкозамином и N-ацетил-мурамовой кислотой, входящих в состав бактериальных клеток (Voman et al., 1974). *Дефензины* и *цекропины* являются пептидами с небольшой молекулярной массой и потенциальной бактерицидной активностью, они действуют на клетки - мишени по ионофорному механизму, блокируя генерацию АТФ и нарушая протонный градиент клеток, что приводит к их гибели (Brown et al., 2009). *Цекропины* - это основные белки с бактерицидной активностью (Vogel et al., 2011). Показано существование четырех цекропинов у *G. mellonella*, включая цекропин Д (Vogel et al., 2011). *Галериомицин* - дефензин, подобный пептид, который экспрессируется не только клетками жирового тела, но и тканью кишечника насекомых при проникновении бактериальных и грибных патогенов (Schuhmann et al., 2003; Lee et al., 2004; Bergin et al., 2006). *Галиомицин* - фунгицидный дефензин-подобный цистеин-обогащенный пептид *G. mellonella*. Галиомицин идентифицирован в гемолимфе *G. mellonella* после инъекции бактерий *Micrococcus luteus* и *Escherichia coli* в гемоцель насекомым (Brown, 2009). *Гловерин* является индуцибельным белком, активным по отношению к грамположительным бактериям. Он взаимодействует с липополисахаридами бактерий, увеличивая проницаемость и ингибируя формирование внешней мембраны бактерий (Vogel et al., 2011; Yang et al., 2011; Hwang, Kim, 2011; Xu et al., 2012). Этот пептид является антибактериальным пептидом, который, как предполагается, может выступать в роли медиатора иммунных защитных реакций. *6-Тох* является специфическим для отряда чешуекрылых, экспрессия

которого происходит преимущественно в жировом теле, гемоцитах и кишечнике, в ответ на бактериальную инфекцию (Lee et al., 2010).

Таким образом, синтез АМБ может происходить системно в клетках жирового тела, а также локально, то есть в тканях и органах, непосредственно контактирующих с окружающей средой и, соответственно, потенциальными патогенами, в эпителии кутикулы, кишечника, трахей, копулятивных органов. Синтез АМБ осуществляется конституционально на определенном уровне, а также может быть индуцирован ранением, стрессом, проникновением патогенных микроорганизмов и/или их метаболитов, как в гемоцель, так и в другие ткани и органы насекомых. Кроме увеличения синтеза АМБ может происходить активация экспрессии генов, связанных с иммунным ответом насекомых, таких, как гены стресса или медиаторов иммунного ответа (Wojda et al., 2009).

Известно, что как инъекция бластоспор, так и перкутанное заражение грибами приводят к активации экспрессии АМБ в жировом теле (Wojda et al., 2009; Dubovskiy et al., 2013a). Однако их значение при микозе до конца не ясно. Показано что галлериомицин и галиомицин обладают фунгистатическими свойствами, но их активность невелика (Lee et al., 2004; Brown et al., 2008). К сожалению, практически не существует исследований по изучению антибактериального иммунного ответа насекомых отряда *Lepidoptera* на пероральную бактериальную инфекцию БТ, хотя поглощение бактерий с пищей является естественным путем проникновения бактерий в организм насекомого в природе. Но в существующих редких работах, которые рассматривают кишечный инфекционный процесс, изучают синтез АМБ только в жировом теле, в то время, как локальный синтез АМБ, в кишечнике, месте проникновения и развития патогена, может играть важную роль на первых этапах воздействия бактерий и их метаболитов на организм насекомых. Актуальным остается также вопрос о роли как системного, так и локального иммунного ответа при развитии бактериальной и грибной инфекции, а также вклад АМБ в эволюцию резистентности к патогенам.

1.3.3. Антиоксидантная и детоксицирующая системы

У аэробных организмов постоянно происходит генерация активированных кислородных метаболитов. К активированным кислородным метаболитам (АКМ) относят образующиеся в результате взаимодействия с кислородом радикалы и соединения не радикальной природы, такие, как супероксид анион, перекись водорода, гидроксильный радикал, оксид азота, перекисные и алкоксильные радикалы и т.д. (Зенков и др., 2001; Глупов и др., 2009).

Повышение уровня синтеза активированных кислородных метаболитов в результате каких-либо воздействий может быть токсично, как для проникающих паразитов, так и для организма, поскольку эти соединения обладают высокой реакционной и окислительной способностью (Зенков и др., 2001; Комаров и др., 2006). В процессе формирования защитных механизмов от свободно радикального окисления в организме животных, в том числе насекомых, сформировалась антиоксидантная система, инактивирующая радикальные соединения.

В клетках основными источниками образования *супероксидного аниона* ($O_2^{*\cdot}$) являются ферментативные системы НАДФ-Н-оксидазы фагоцитирующих клеток, митохондриальная цитохром С оксидаза, микросомальные монооксигеназы. Продукция многих цитотоксических веществ начинается при взаимодействии веществ не радикальной природы с супероксиданионом. *Перекись водорода* (H_2O_2) образуется в пероксисомах, как продукт реакции, катализируемой оксидазами, например, в реакциях дисмутации, катализируемых супероксиддисмутазой (СОД). *Гидроксильный радикал* (OH^*) является наиболее реакционным из АКМ. Считается, что основным его источником служит реакция Фентона с участием металлов переменной валентности, которые реагируют с перекисью водорода, хотя возможны и другие реакции. Образование *оксида*

азота (NO) в организмах животных происходит при ферментативном окислении NO-синтазой L-аргинина во многих клетках и тканях (Nappi et al., 1995; Nappi, Vass, 1998). Развитие цепных радикальных окислительных процессов сопровождается образованием *перекисных* RO_2^* и *алкоксильных радикалов* RO^* . Подобные соединения могут образовываться как в различных клетках, в том числе гемocyтах, так и непосредственно в плазме насекомых.

АКМ принимают участие в физиологических процессах жизнедеятельности насекомых, таких, как клеточная пролиферация (Allen, Balin, 1989; Cross, Jones, 1991), регуляция метаболических процессов (Cross, Jones, 1991; Qazi, Trimmer, 1999; Nappi et al., 2000). АКМ могут активировать транскрипционные факторы, которые координируют продукцию ряда иммунорегуляторных компонентов (цитокинов), молекул адгезии и белков с протекторной функцией. Кроме того, АКМ, обладая цитотоксическими свойствами, могут непосредственно участвовать в формировании иммунного ответа, в частности, таких реакциях, как инкапсуляция (Nappi et al., 2000), фагоцитоз (Свистунова, Титов, 1992), меланизация (Cerenius, Soderhall, 2004). В процессе меланогенеза происходит каскад ферментативных и неферментативных реакций, одним из конечных продуктов которого является меланин. Некоторые из промежуточных продуктов меланогенеза (семихиноны) способны непосредственно проявлять антибактериальную активность в силу своей радикальной природы, а также при взаимодействии с водой и кислородом могут образовывать перекись водорода, которая также обладает высокой антибактериальной активностью (Cerenius, Soderhall, 2004; Komarov et al., 2009).

Следует отметить, что данные соединения (радикалы и активированные кислородные метаболиты) не обладают специфичностью действия и способны разрушать клетки, в том числе, и собственного организма. Можно выделить четыре наиболее вероятных мишени для АКМ: группы фосфолипидов мембран, в результате воздействия на которые происходит индукция процессов перекисного окисления липидов (Jamieson, 1989, Владимиров и др., 1991); мембраносвязанные

белки (Richards et al., 1988; Dean et al., 1997); различные ферменты (Willson, 1985; Drapier, Hibbs, 1988) и ДНК/РНК (Hoffman et al., 1984; Beck, Levander, 1998).

Ферментативные антиоксиданты

Система антиоксидантной защиты включает в себя ферментативные и не ферментативные антиоксиданты. Ферментативные антиоксиданты характеризуются высокой специфичностью действия, направленной против определенных форм АКМ, а также специфичностью клеточной и органной локализации.

Супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1) (СОД) - это металлопротеин, служащий для регуляции уровня супероксид-аниона ($O_2^{\cdot-}$), существенно ускоряет реакцию дисмутации $O_2^{\cdot-}$ в перекись водорода (H_2O_2). Фермент в большей степени, локализован в органах насекомых, где активно идут окислительно-восстановительные процессы: средний кишечник, жировое тело, мальпигиевые сосуды (Ahmad, 1976). *Каталаза* (1.11.1.6) (Кат) это гемсодержащий фермент, катализирующий разложение перекиси водорода с образованием молекулярного кислорода (Зенков и др., 2001). Высокая активность данного фермента была показана в гемолимфе насекомых отряда чешуекрылых (Ahmad, 1992; Wang et al., 2001). *Глутатион-S-трансфераза* (ГСТ) относится к группе глутатионзависимых ферментов и выполняет функцию как антиоксидантных, так и детоксицирующих ферментов. *Аскорбатпероксидаза* (КФ 1.11.1.1) катализирует окисление аскорбиновой кислоты до дегидроаскорбиновой кислоты, восстанавливая при этом H_2O_2 и органические гидроперекиси (Зенков и др., 2001).

Неферментативные антиоксиданты

Несмотря на то, что в органах насекомых обнаруживается активность многих антиоксидантных ферментов, ряд авторов считают, что первостепенная роль в антиоксидантной защите насекомого, особенно в пищеварительном тракте, принадлежит неферментативным антиоксидантам, которые вступают в окислительно – восстановительные (ОВ) реакции и отдают электрон для

нейтрализации свободных радикалов (Hirayama et al., 1989; Strand, Pech, 1995; Wang et al., 2001; Dubovskiy et al., 2008). В роли неферментативных антиоксидантов могут выступать многие соединения, поскольку высокая реакционная способность АКМ приводит к выбиванию электрона из практически любой имеющейся молекулы. В основном, эти соединения можно разделить на две группы по наличию фенольных или тиоловых компонентов.

Фенольные антиоксиданты содержат в своей структуре ароматическое кольцо, связанное с одной или несколькими гидроксильными группами. К ним относятся токоферолы, токотриенолы, каротиноиды, флавоноиды, аскорбиновая кислота (Зенков и др., 2001).

Ряд белков могут обладать антиоксидантными свойствами, благодаря наличию ионов металлов, которые выполняют функцию хелатирования (ферритин и трансферрин), но, в основном, за счет восстановленных тиольных групп. Кроме того, в организме различных животных, в том числе насекомых, существуют высокореакционные *тиолсодержащие антиоксиданты*, такие как *глутатион* и цистеин. Необходимо отметить, что глутатион также участвует в работе таких ферментов как ГПО и ГСТ (Зенков и др., 2001). При развитии различных патогенезов, сопровождающихся дисфункцией клеток и органов, происходит увеличение АКМ, в результате чего может наблюдаться изменение соотношения восстановленных и окисленных тиолов, что может являться с одной стороны показателем окислительного стресса организма, с другой - важным критерием неспецифической резистентности организма (Янковский, 2000; Мартемьянов и др., 2006; Глупов и др., 2009).

Одновременное функционирование систем, как продуцирующих кислородные радикалы, так и антиоксидантной, позволяет предотвратить развитие микроорганизмов, проникших в организм насекомых, и, в то же время, защитить организм насекомых от тотальной интоксикации организма АКМ. В свою очередь у паразитов формируются механизмы защиты и агрессии, способствующие их проникновению и успешному развитию в организме

насекомых, а в ряде случаев и предотвращающие вторичное заражение или развитие авирулентных микроорганизмов. Стратегия защиты патогена от токсичного действия АКМ может осуществляться за счет наличия плотной поверхностной структуры, способной противостоять воздействию АКМ хозяина (Strand, Pech, 1995). Следует отметить, что при воздействии паразитов на клетки и ткани насекомых могут запускаться процессы перекисного окисления липидов, что может существенно сказаться на функционировании организма. Патогену, на определенном этапе патогенеза, может быть выгодно токсичное воздействие АКМ на организм хозяина, например, для разрушения клеток насекомых с целью проникновения в организм, в тоже время это может быть стратегией защиты от развития вторичных инфекций. Так было показано, что вирусная инфекция развивается в организме *Trichoplusia ni* и *Spodoptera frugiperda* в условиях возрастающего уровня окислительного стресса, который характеризуется снижением активности компонентов антиоксидантной защиты (Wang et al., 2001). Однако, паразит также может снижать генерацию АКМ, зачастую нарушая работу защитных реакций, связанных с меланогенезом (инкапсуляция, гранулообразование). В этих случаях пониженный уровень АКМ позволяет успешно развиваться в гемоцеле хозяина. Для некоторых паразитов характерна стратегия запуска меланогенеза в организме хозяина, потому что образующийся меланин может выполнять функцию «ловушки» цитотоксических молекул.

К сожалению, функционирование антиоксидантной системы у насекомых при действии патогенов к настоящему времени остается малоизученным (Соколовский, 1988; Wang et al., 2001; Лозинская и др., 2004; Dubovskiy et al., 2008). Существуют единичные работы, в которых показано участие компонентов антиоксидантной системы насекомых при развитии вирусной инфекции (Wang et al., 2001). Кроме того, при изучении микроспориоза личинок большой вошинной огневки *G. mellonella*, вызванного микроспоридиями *Vairimorpha ephestiae*, было показано, что при массовом образовании спор в тканях хозяина происходит увеличение активности ферментативных антиоксидантов (Лозинская,

2002; Лозинская и др., 2004). Проведены лишь спорадические исследования, посвященные изучению антиоксидантной системы при микозах и кишечных бактериозах (Sree, Padmaja, 2008). При остром, летальном микозе было отмечено резкое повышение генерации АКМ, что, вероятно, связано с повышенной меленизацией гриба в покровах (Slepneva et al., 2003). Было показано, что при развитии бактериальной инфекции БТ антиоксидантная система участвует в защитных механизмах насекомых, за счет ингибирования свободнорадикальных реакций (Dubovskiy et al., 2008). Однако, вопрос о роли антиоксидантной системы при развитии сублетальных кишечных бактериальных инфекций остается малоизученным.

Детоксицирующие ферменты

Детоксикация чужеродных веществ в организме насекомых осуществляется при участии микросомальных монооксигеназ, неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз (Рославцева и др., 1993; Prabhakaran, Kamble, 1995; Pritsos et al., 1998; Gatehouse, 2002).

Микросомальные монооксигеназы - (КФ 1.13) относятся к классу оксидоредуктаз и катализируют включение в субстраты атомов или молекулы кислорода (Scott, We, 2001; Зенков и др., 2001). У эукариотических организмов монооксигеназы локализованы в мембранах эндоплазматического ретикулума и митохондриях. Они выполняют много важных задач в организме, от синтеза и деградации экистероидов и ювенильных гормонов, до метаболизма ксенобиотиков естественного или синтетического происхождения.

Неспецифические эстеразы относятся к классу гидролаз, которые ускоряют разложение сложных эфиров до спирта и кислоты (Диксон, Уэбб, 1982). Эстеразы локализованы в жировом теле, крыловых мышцах, кишечнике, гемолимфе насекомых. Комплекс эстераз обеспечивает мобилизацию липидов, в том числе жиров в жировом теле; деградацию метаболически инертных эфиров, в том числе и различных ксенобиотиков; синтез и отчасти транспорт кутикулярных восков;

контроль титра гормонов, в частности ювенильного гормона (Рославцева и др., 1990, 1993; Рославцева, 1994). Исключительная роль эстераз насекомых в процессах детоксикации химических инсектицидов и формировании устойчивости к ним показана многими авторами (Li, 2007; Крюков и др., 2008; Mamidala et al., 2011).

Глутатион-S-трансферазы (ГСТ) представляют собой группу ферментов (КФ 2.5.1.18), использующих восстановленный глутатион для конъюгации с гидрофобными соединениями и восстановления органических пероксидов (Snyder, Maddison, 1997; Зенков и др., 2001). Основная функция ГСТ заключается в защите клеток от ксенобиотиков и продуктов перекисного окисления липидов. При изучении тканевой специализации ферментов показано, что у личинок чешуекрылых наибольшая активность ГСТ регистрируется в жировом теле, по сравнению с тканями кишечника, кутикулой и гемолимфой (Wang et al., 2001).

Роль ферментов детоксицирующей системы наиболее хорошо изучена при действии инсектицидов и развитии устойчивости к ним (Willoughby et al., 2006; Li et al., 2007; Mamidala et al., 2011). При действии патогенов роль детоксицирующих ферментов изучена слабо. Данные ферменты не обладают строгой субстратной специфичностью по отношению к ксенобиоткам. Существует ряд работ, показывающих экспрессию детоксицирующих ферментов при микроспоририозах (Соколова, Сундуков, 1999; Воронцова и др., 2006), а также работы по изучению этих ферментов при вирозах насекомых (Мартемьянов и др., 2009). Кроме того, показано увеличение активности и количества изоформ эстераз при развитии грибных заболеваний насекомых (Серебров 2000; Серебров и др., 2001, 2003, 2005, 2006; Zibae et al., 2009). Существуют лишь единичные работы, свидетельствующие о том, что увеличенная активность неспецифических эстераз является основой повышения устойчивости резистентных популяций насекомых к бактериям БТ (Gunning et al., 2005; Carey et al., 2011).

Таким образом, компоненты детоксицирующей системы могут выполнять функции как антиоксидантной, так и детоксицирующей системы, которые важны

для жизнедеятельности организма и нейтрализации токсинов и метаболитов паразитов, а также эндогенных метаболитов, образующихся в клетках собственного организма в процессе развития инфекционного процесса. На данный момент вопрос о значении АКМ и антиоксидантов, а также их баланса, как одного из возможных механизмов резистентности насекомых к бактериям и грибам, остается открытым.

1.4. Заключение

В процессе коэволюции насекомых и энтомопатогенных микроорганизмов происходит развитие различные адаптивных механизмов определяющих устойчивое существование динамичных систем хозяин-паразит как на организменном, так и на популяционном уровнях. Для сохранения жизнеспособности организма и популяции в целом насекомые используют комплексную защитную систему, осуществляющую нейтрализацию и элиминацию патогена. Традиционно к факторам врожденного иммунитета беспозвоночных относят: гемоцитарную систему, систему коагуляции гемолимфы, фенолоксидазный каскад, лектины, систему антимикробных белков. К наиболее распространенным критериям общей оценки состояния врожденного иммунитета насекомых относят определение титра гемоцитов, их типизацию, активность фенолоксидаз гемолимфы, активность инкапсуляции и фагоцитоза, антибактериальную активность гемолимфы (Schmid-Hempel, 1995). В настоящее время активно изучаются основные механизмы иммунитета беспозвоночных и молекулярно-биохимические основы их действия (Gupta, 2001, Kanost et al., 2004, Kim, Kim, 2005), при этом практически отсутствуют комплексные работы по изучению эволюционных вопросов формирования резистентности к энтомопатогенным грибам и бактериям.

Кристаллообразующие бактерии БТ широко распространены в природе и активно используются как основа для биологических средств защиты растений (Schnepf et al., 1998; Maagd et al., 2001, 2003; Griffiths, Aroian, 2005; Бахвалов и др.,

2006). Использование данных бактерий, как основы для создания биопрепаратов, обусловлено тем, что в процессе вегетативного роста и спорообразования бактерии синтезируют токсины, высокоспецифичные к эпителиальным клеткам кишечника насекомых. Кроме того, БТ успешно нарабатываются в большом количестве в производственных условиях. Препараты на основе этих бактерий способны конкурировать с химическими средствами защиты растений (по стоимости, эффективности, простоте производства и т.д.), при этом они обладают минимальным воздействием на внешнюю среду. Однако, при многократном использовании препаратов на основе БТ в агроценозах начинают формироваться устойчивые популяции вредителей. Наиболее быстрое возникновение устойчивых насекомых происходит при питании насекомых на трансгенных растениях, созданных с использованием генов различных токсинов БТ (Gunning et al., 2005). Перспективным подходом для повышения эффективности применения биологических препаратов на основе БТ является разработка и создание методов преодоления основных защитных реакций насекомых к бактериям. Как правило, БТ постоянно присутствует в природной среде и, как результат, в кишечнике насекомых. Однако в силу слабой вирулентности или отсутствия специфичности, бактерии БТ не могут вызывать серьезных заболеваний, приводящих к летальному исходу. Однако при определенных условиях бактерии БТ, могут вызывать локальные эпизоотии (Штейнхауз, 1952). До конца не ясно, за счет каких механизмов может происходить элиминация или снижение активности этих бактерий в кишечнике насекомых при выздоровлении, а также, какие причины могут вызывать развитие эпизоотий.

Естественный путь проникновения БТ в организм насекомых – пероральный (Vallet-Gely et al. 2008). В случае БТ инфекции первичный барьер на пути патогена, это кишечник. Принято считать, что основной вклад в развитие патогенеза БТ вносит эндотоксин (Pigott, Ellar, 2007). Соответственно на данном этапе инфекции, устойчивость насекомых к БТ может возникать в результате нарушения при растворении кристалла и активации протоксина (Oppert et al.,

1994), повышенной регенерации эпителиальных клеток (Martinez-Ramirez et al., 1999), мутации в генах кодирующих рецепторы к токсину БТ (Gahan et al., 2001; Darboux et al., 2002). Однако все эти механизмы были описаны при межвидовых отличиях в устойчивости к БТ, либо для линий насекомых, имеющих значительные (100-1000 кратные) увеличения резистентности к токсину БТ, возникшие в результате длительного и очень «жесткого» отбора в полевых условиях на трансгенных растениях. Для линий насекомых с небольшими уровнями устойчивости (5-20), характерными для ранних этапов отбора, исследования механизмов резистентности носит спорадический характер.

Общеизвестно, что Сгу-токсины БТ могут вызывать кишечный токсикоз, даже без участия вегетативных клеток БТ. По сути это является химическим или биохимическим токсикозом. Однако, следует отметить, что бактериальные клетки БТ и компоненты микрофлоры могут участвовать в инфекционном процессе. Это связано с тем, что даже небольшие повреждения клеток эпителия токсинами БТ могут открывать ворота для инфекции. Соответственно наиболее эффективной защитой насекомых от инфекции будут комплексные защитные реакции. На данный момент уже известно, что реакции иммунитета принимают участие в защите от бактерий БТ (Kwon, Kim, 2007; Broderick et al., 2010; Richards, Dani, 2010; Shrestha et al., 2010). Хотя непонятно, каков же вклад реакций клеточного и гуморального иммунитета при эволюции резистентности к БТ. Можно предположить, что на ранних этапах бактериоза, когда происходит повреждение небольшого числа клеток, компоненты клеточного и гуморального иммунитета могут препятствовать развитию септицемии, а также снижать риски повреждения кишечника за счет секреции продуктов иммунной системы во внутрикишечное пространство. Но не ясно, могут ли данные компоненты иммунной системы выступать в качестве микроэволюционных механизмов, отвечающих за повышение устойчивости и резистентность насекомых к БТ. Следует отметить, что на данный момент известно, что кишечная микрофлора может быть дополнительным фактором, усиливающим вирулентность БТ (Broderick et al.,

2006), однако облигатная роль микрофлоры в патогенности БТ все еще обсуждается (van Frankenhuyzen et al., 2010).

Грибы родов *Beauveria* и *Metarhizium* являются второй по популярности (после бактерий БТ) основой для биологических препаратов. В настоящее время ведутся активные работы по созданию трансгенных форм данных грибов, обладающих повышенной вирулентностью. Кроме того, на основе данных грибов постоянно разрабатывают комплексные и комбинированные биопрепараты. Данные грибы синтезируют разнообразные гидролитические ферменты, которые позволяют проникнуть через кутикулу, а также токсины, подавляющие иммунитет и препятствующие развитию вторичных инфекций (Vey et al., 2002). Кроме того, у грибов возникли адаптации, позволяющие избегать распознавания иммунной системой хозяина в гемоцеле. В частности, гифальные тела грибов *Metarhizium anisopliae* покрыты коллаген-подобной оболочкой, препятствующей их распознаванию и запуску защитных реакций у насекомого (Wang, St. Leger, 2005).

Существуют многочисленные исследования механизмов резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам паразитам, а также факторов, запускающих развитие заболевания (Hajek, Leger, 1994; Gupta, 2001; Глупов и др., 2001; Kanost et al., 2004). Однако основные исследования сосредоточены на отдельных защитных реакциях и отсутствует комплексный подход, позволяющий оценить общую стратегию формирования противогрибной резистентности у насекомых (Bogus et al., 2007; Wojoda et al. 2009; Vilcinskas, 2010). Практически не охарактеризованы ключевые внутривидовые защитные стратегии насекомых, позволяющие противостоять паразиту на популяционном уровне. Также при развитии микозов у насекомых неизвестным остается вклад отдельных индуцибельных механизмов, таких как: синтез противомикробных пептидов и белков, фенолоксидазная активность в кутикуле, инкапсуляция и генерация активированных кислородных метаболитов. Остается полностью открытым вопрос о микроэволюционных механизмах формирования устойчивости к грибам

у насекомых. Практически неизвестны ключевые факторы вирулентности, возникающие или усиливающиеся у грибов при длительном развитии (в течение нескольких поколений) на определенной популяции или виде хозяина.

Существенное значение при развитии бактериальных и грибных патогенов играют начальные стадии развития болезни. На данных этапах развивается токсикоз организма хозяина, для предотвращения которого могут активироваться механизмы инактивации и элиминации токсинов. Для позвоночных животных данные функции отмечены для антиоксидантной и детоксицирующей систем (ферментные и неферментные) (Зенков и др., 2001). Хорошо известно, что данные системы определяют устойчивость насекомых к химическим инсектицидам (James, Xu, 2012). Однако, исследований функций данных систем при токсикозах вызываемых энтомопатогенными микроорганизмами практически не проводилось. За исключением спорадических работ при изучении микозов (Серебров и др., 2006) и микроспоридиозов (Лозинская и др., 2004).

Вопросы взаимосвязи механизмов резистентности и показателей выживаемости популяции практически не обсуждаются. Хотя предполагается, что влияние патогенов на насекомое, как фактора отбора может приводить к распределению энергетических «затрат» с одной стороны на защитные системы, увеличивая шансы выживания особи, а с другой - на репродуктивный потенциал насекомых, увеличивая шансы выживания популяции (Sheldon, Verhulst, 1996; Zuk, Stoehr, 2002; Rolff, Siva-Jothy, 2003; Schmid-Hempel, 2005).

Таким образом, эволюционные, экологические, физиолого-биохимические и молекулярные аспекты формирования резистентности насекомых к энтомопатогенам в ходе микроэволюционных процессов, несмотря на их актуальность, остаются практически не изученными. Отсутствуют модели, позволяющие анализировать эволюцию резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам. Практически не изучены механизмы резистентности насекомых к БТ не связанные с мутациями сайтов связывания Сгу-токсинов.

Открыты вопросы об эволюционно-экологических аспектах взаимоотношений между насекомыми и их патогенами. На основе спорадических работ сложно дать ответ на вопрос: «Какие защитные механизмы задействованы в формировании резистентности и чем "платит" организм насекомого за повышение устойчивости к энтомопатогенам?».

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Насекомые

Объектом исследований служили личинки большой вощинной огневки *Galleria mellonella* L. (*Lepidoptera, Pyralidae*) лабораторной популяции (ИСиЭЖ), отличающиеся темной окраской и собранные в 2006 г. в Баганском районе НСО. В ряде экспериментов использовали личинок вощинной огневки другой лабораторной популяции (Университет Свансеа, Великобритания). Это была морфа со светлой окраской кутикулы. Насекомые были собраны в средней части Европы (Бельгия, Германия). Насекомых содержали при 28°C, в темноте, на искусственной питательной среде (ИПС), содержащей кукурузную крупу (22.5%), цветочный мед (12.5%), глицерин (12.5%), пчелиный воск (12.5%), пшеничную муку (10%), сухое молоко (12.5%), дрожжи (5%) и дистиллированную воду (12.5%) (Тамарина, 1987).

2.2. Энтомопатогенные микроорганизмы

2.2.1. Бактерии

Для заражения насекомых использовали споро-кристаллическую смесь высоковирулентного штамма 69-6 *Bacillus thuringiensis* ssp. *galleriae* (серотип H5ab). Штамм бактерий был взят из коллекции лаборатории патологии насекомых Института систематики и экологии животных СО РАН (Бурцева и др., 2001; Хвощевская и др., 2005).

2.2.1.1. Заражение насекомых бактериями и моделирование сублетальной и полулетальной инфекции

Пероральное заражение насекомых проводили при содержании личинок *G. mellonella* группами по 30 штук в чашке Петри на ИПС, в состав которой была добавлена споро-кристаллическая суспензия бактерий БТ штамм 69-6 (1 мл споро-кристаллической суспензии на 3 г ИПС). Для достижения сублетального инфицирования насекомых (ЛК15%) использовали титр 5×10^8 спор и кристаллов бактерий на 1 мл суспензии. Для достижения полулетальной инфекции (ЛК50%) использовали титр споро-кристаллической смеси 5×10^9 спор и кристаллов бактерий на 1 мл суспензии. Оценку показателей клеточного и гуморального иммунитета, антиоксидантной и детоксицирующей систем проводили на первые, вторые и третьи сутки после заражения (Dubovskiy et al., 2008a, Grizanova et al., 2014).

2.2.1.2. Селекция насекомых на устойчивость к бактериям *B. thuringiensis*

Для селекции насекомых на устойчивость к бактериям БТ использовали личинок *G. mellonella* из лабораторной популяции лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН. Популяция была разделена на две группы. Первую из них селектировали на устойчивость к бактериям *B. thuringiensis* ssp. *galleriae* (селектированная линия), вторую оставляли без селекции (контрольная линия). Около тысячи насекомых использовали для селекции первые три поколения, затем около четырехсот личинок на каждое перезаражение последующих поколений. Такое количество насекомых на линию достаточно для избегания эффекта инбридинга (Roy, Kirchner, 2000). Для селекции использовали личинок *G. mellonella* третьего - пятого возраста. Насекомых содержали группами по 30 личинок в чашке Петри на ИПС, в состав которой была добавлена споро-

кристаллическая суспензия *B. thuringiensis* ssp. *galleriae*, в титре, приводящем к гибели 50% особей (ЛК50%). Выживших после инфицирования насекомых (не менее 100 особей) пересаживали в общий садок на ИПС, не содержащую бактерий, и получали следующее поколение. Личинок третьего - пятого возраста следующей генерации вновь инфицировали бактериями, используя ЛК50% бактерий. В ходе отбора доза бактерий постепенно увеличивалась и составляла для 1-5 поколений 5×10^8 , с 5-10 - 10^9 , с 10-20 - 5×10^9 . Для поддержания контрольной линии использовали такое же количество насекомых, что и для селектированной линии. Уровень резистентности насекомых селектированной линии при заражении бактериями *B. thuringiensis* ssp. *galleriae* оценивали на личинках пятого, десятого, пятнадцатого и двадцатого поколений с помощью ЛК50% бактерий БТ. После семнадцатого поколения насекомых селектированной линии оставляли три поколения без воздействия фактора отбора – бактерий БТ, для изучения механизмов наследования. Изучение защитных систем проводили на личинках 20-го поколения на второй день после заражения.

2.2.2. Грибы

Для исследований использовались штаммы энтомопатогенных грибов *Metarhizium robertsii* (Metsch.) Sorokin из коллекции ИСиЭЖ СО РАН (штамм Р-72). Штамм Р-72 изолирован в 1972 г. из погибших личинок колорадского жука *L. decemlineata* в Латвии (Serebrov et al., 2007), характеризуется высокой вирулентностью и токсигенной стратегией (Glupov et al., 2003; Крюков и др., 2007a,b; 2011; Ходырев и др., 2014). Видовая идентификация культур проведена на основе световой микроскопии и анализа нуклеотидных последовательностей ITS, IGS, EF1a, RPB1 регионов (Bischoff et al., 2009). Грибы сохраняли на агаризованных искусственных питательных средах (ИПС) Ваксмана, Чапека, Сабуро (Литвинов, 1969), и пересевали 2 раза в год. Для наработки конидиальной массы грибов применяли двухфазное культивирование. Первая фаза – наработка

глубинной культуры на жидкой среде Чапека с добавлением пептона (0.4%) в шейкере-инкубаторе, при 120 об/мин, 24°C, в течение 6 суток. В дальнейшем инокулюм (2 мл) вносили в чашки Петри (d=15см) на дважды автоклавируемое пшено. После 3-х недельного культивирования, конидиальную массу высушивали при комнатной температуре (23-25) и измельчали в кофемолке. Титр полученной конидиальной массы определяли при помощи серийных разведений и рассевов на ИПС, с дальнейшим подсчетом колоний. Бластоспоры грибов получали методом глубинного культивирования в жидкой среде Чапека с пептоном (0.4%) в шейкере при 130 об./мин, 25–27°C в течение 4–5 суток. Подсчет титра бластоспор проводили на световом микроскопе.

2.2.2.1. Заражение грибами

Насекомых обрабатывали перкутанно, погружая в водную суспензию конидий грибов (с добавлением TWEEN 0.03%) на 10 сек. Контрольную группу насекомых обрабатывали дистиллированной водой (с добавлением TWEEN 0.03%) (Inglis et al., 2007; Dubovskiy et al., 2013a,b; Kangassalo et al., 2015). Учет смертности во всех экспериментах проводился ежедневно.

2.2.2.2. Селекция на устойчивость к грибу *B. bassiana*

Для селекции насекомых на устойчивость к грибу *B. bassiana* использовали личинок *G. mellonella* из лабораторной популяции лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН. Популяция была разделена на две группы. Первую из них селектировали на устойчивость к грибу *B. bassiana* (селектированная линия), вторую оставляли без селекции (контрольная линия). Около тысячи насекомых использовали для селекции первые три поколения, затем около

четырёхсот личинок на каждое перезаражение последующих поколений. Для селекции использовали личинок *G. mellonella* четвертого - пятого возраста. Насекомых перкутанно заражали конидиями гриба в концентрации 5×10^6 для достижения ЛК 40-50. Насекомых содержали группами по 10 личинок в чашке Петри на ИПС. Выживших после инфицирования насекомых (около 200 особей) пересаживали в общий садок на ИПС, и получали следующее поколение. Личинок третьего - пятого возраста следующей генерации вновь инфицировали грибами. Для поддержания контрольной линии использовали такое же количество насекомых, что и для селектированной линии. Уровень резистентности насекомых селектированной линии оценивали при заражении грибом на личинках пятого, десятого, пятнадцатого, двадцатого и двадцатьпятого поколений используя ЛК50 гриба. Изучение защитных систем проводили на личинках 25-го поколения на первый день после заражения.

2.2.3. Характеристики адгезии и роста грибов на насекомых

2.2.3.1. Уровень адгезии конидий на кутикуле насекомых

Для определения уровня адгезии конидий на кутикуле насекомых использована методика Д. Мент с соавторами (Ment et al., 2010a; Ment et al., 2010b) с небольшими изменениями. Личинки насекомых через 6 часов после заражения грибами были помещены в водный раствор твина (0.03%) на 5 с при 180 об./мин вортекса для смыва не прикрепившихся конидий. Затем насекомые были высушены на фильтровальной бумаге в течение 20 секунд и помещены в стеклянные пробирки (8 мл) содержащие 4 мл 99%-го дихлорметана. Пробирки с насекомыми и дихлорметаном встряхивались в шейкере при 160 об./мин в течение 8 мин для смыва прикрепившихся конидий. После удаления насекомых в пробирки добавляли 4 мл этанола (99%). Осаждение конидий проводили при 6000 g и 25°C в течение 30 мин. Убирали супернатант, а осадок

высушивали под вытяжкой при комнатной температуре. Высушенные конидии ресуспензировали в водном растворе твина (0.05%) и подсчитывали в гемоцитометре.

2.2.3.2. Уровень прорастания конидий на кутикуле насекомых и ее экстрактах

Для определения уровня прорастания конидий на кутикуле использовали методику Т.М. Бутта с некоторыми модификациями (Butt, 1997) Насекомых, зараженных грибами, фиксировали в 2% формальдегиде и сохраняли при +4°C. Перед микроскопией каждая личинка была помещена в водный раствор калькофлюора белого (0.1%) на 10 сек, затем помещена на предметное стекло для подсчета проросших и не проросших конидий на кутикуле с помощью флуоресцирующего микроскопа Axioscop 40 не менее чем в 10 полях зрения.

Для определения уровня прорастания конидий на экстрактах кутикулы проводили последовательный смыв кутикулярных липидов двумя растворителями (Gilby, 1980; Jarrold et al., 2007; Wang, St. Leger, 2005). Для смыва неполярной фракции липидов, насекомых помещали колбу с гексаном (99%) (из расчета 3 мл растворителя на 1 личинку) и встряхивали на шейкере 7 мин при 160 об./мин. Затем экстракт переливали в другую колбу и аналогичным способом проводили смыв полярной фракции дихлорметаном (99%). Экстракты были высушены в вакуумной сушке до объема 0.5 мл, после чего их раскапывали на покровные стекла (50 мкл на 1 стекло). Сразу после высыхания экстрактов стекла были помещены в 90 мм чашки Петри на поверхность 20% агарозы, засеянной конидиями грибов. Через 24 ч инкубации при 27°C осуществляли подсчет проросших и не проросших конидий с помощью светового микроскопа.

2.2.3.3. Определение гриба в гемолимфе насекомых

Для детекции гриба в гемолимфе использовали модифицированную методику Ю. Парка и Ё. Кима (Park, Kim, 2011). Зараженных насекомых промывали в стерильной воде на шейкере в течении 10 сек, затем отбирали гемолимфу с висячей капли (для предотвращения попадания спор грибов с поверхности кутикулы в образец). В анализ отбирали 10 мкл гемолимфы личинок *G. mellonella* и немедленно смешивали с 40 мкл стерильного 10 мМ фосфатного буфера pH 7.2 с 150 мМ NaCl (ФБ), содержащего фенилтиомочевину (0.4%). Полученную смесь помещали на среду Чапека с молочной кислотой (0.4%), растирали шпателем и инкубировали 3–5 суток при 25°C после чего подсчитывали колонии грибов.

2.2.4. Анализ микрофлоры в кишечнике насекомых

Для идентификации бактерий были использованы регионы V3-V4 гена 16S рРНК. ПЦР была проведена в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 0.7 U Phusion Hot Start II High-Fidelity and 1× Phusion GC buffer (Thermo Fisher Scientific), 0.2 μM каждого праймера 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al., 2012), 10 ng ДНК анализируемого образца, 2.3 мМ MgCl₂ (Sigma-Aldrich) и 0.2 мМ каждого из dNTP (Life Technologies). Условия ПЦР реакции: денатурация при 98°C по 1 мин, 30 циклов (15 с при 98 °C, 15с при 62 °C, и 15 с при 72 °C), затем 10 мин при 72 °C. Затем 200 нг продукта ПЦР реакции от каждого образца очищали с помощью MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen). Библиотеки образцов для секвенирования были подготовлены согласно протоколов для MiSeq (Illumina) (Caporaso et al., 2011; Caporaso et al., 2012). Денатурацию образцов проводили при помощи смешивания 4.5 мкл 0.2 М NaOH с 4.5 мкл продукта ПЦР (4 нМ).

Денатурированная ДНК была разбавлена до 14 pM и 510 мкл смешивали с 90 мкл 14 pM Phix library. Полученные 600 мкл образца смешивали с праймерами для секвенирования и загружали в картридж 500-cycle PE kit. Далее проводили секвенирование 2x250 bp на приборе MiSeq Illumina sequencer в ИБХиФМ СО РАН г.Новосибирск.

Биоинформатический анализ полученных сиквенсов был выполнен с помощью пакета программ CloVR-16S версия 1.1 (Angiuoli et al., 2011). В среднем было проанализировано 9210 сиквенсов ДНК на образец (минимум = 3730; максимум = 15775; стандартное отклонение = 4043). Сиквенсы низкого качества удаляли из анализа с помощью QIIME's 1.1.0 (<http://qiime.sourceforge.net/>) (стандартные настройки). Классификация бактерий была выполнена с помощью QIIME согласно RDP classifier. Экологические индексы обилия (richness) (Chao) и биоразнообразия (diversity) (Shannon) были рассчитаны с помощью Mother 1.12.0 (<http://www.mothur.org/>). Статистическая значимость влияния селекции и заражения на состав микрофлоры была рассчитана с помощью Metastats 1.0 (<http://metastats.cbc.umd.edu/>).

2.3. Изучение защитных систем насекомых

2.3.1. Приготовление образцов тканей и органов

Приготовление образцов гемолимфы

Перед отбором гемолимфы поверхность тела насекомых стерилизовали 70% этанолом. Отбор гемолимфы проводили, надрезая четвертый вентральный сегмент кутикулы тела насекомых скарификатором, и забирая выступившую каплю гемолимфы пипеткой со стерильным наконечником. С каждой личинки отбирали по 10 мкл гемолимфы.

Приготовление суспензии гемоцитов

Для приготовления суспензии гемоцитов отбирали по 10 мкл гемолимфы с трех насекомых в 200 мкл охлажденного антикоагулянта (АК) (62 mM NaCl, 100 mM глюкоза, 10 mM ЭДТА, 30 mM цитрат натрия, 26 mM лимонная кислота, pH 4.6). Полученную суспензию центрифугировали при 4°C в течение 5 мин при 500 g. Затем удаляли надосадочную жидкость, осадок клеток ресуспензировали в 200 мкл АК. Таким образом, проводили трехкратное отмывание гемоцитов с АК (Glupov et al., 2001; Крюкова и др., 2007; 2013). Полученную суспензию гемоцитов помещали в соответствующий буфер для определения активности фагоцитоза и ФО активности.

Приготовление гомогенатов кишечника

Для приготовления гомогенатов кишечника насекомых препарировали в ФБ. Извлеченные органы разрушали с помощью ультразвукового гомогенизатора. Затем гомогенаты центрифугировали при 4°C в течение 15 мин при 10000 g. Полученную надосадочную жидкость использовали для анализа активности АО системы и лизоцима.

Приготовление образцов жирового тела, ткани кишечника и покровов для выделения РНК и синтеза кДНК

Перед отбором образцов поверхность тела насекомых стерилизовали 70% этанолом. Для приготовления образцов насекомых препарировали, органы извлекали и помещали в раствор для сохранения РНК (RNA later) при 4°C. Далее образцы тканей извлекали из раствора, замораживали -80°C, а затем лиофилизировали. Разрушение лиофилизированных тканей проводили при помощи жидкого азота. Общая РНК была выделена с использованием гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции (TRIzol®). Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически. Для отчистки от ДНК 2 мг РНК обрабатывали дезоксирибонуклеазой I при 37°C в течение 30 минут. Один мкг полученной РНК использовали для синтеза кДНК реакцией обратной

транскрипции с использованием qScript™ cDNA SuperMix (Quanta Bioscience), в соответствии с инструкциями производителя.

2.3.2. Измерение толщины кутикулы

Нативные личинки 6-го возраста были заморожены при -20°C через 3 дня после линьки. Срез делали через 8 стернит с помощью микротомы (Microm HM 520). Срезы химически фиксировали на поверхности предметного стекла. Для каждой личинки измеряли три среза в трех местах. Измерения производили на световом микроскопе Axioscope 40 с помощью программы AxioVision 40 (v4.6.3.0).

2.3.3. Оценка активности реакций клеточного и гуморального иммунитета

2.3.3.1. Определение активности фагоцитоза

Активность фагоцитоза определяли с помощью ФИТЦ-меченных клеток *Escherichia coli* (Dubovskiy et al., 2008). Бактериальные клетки инъецировали в гемоцель насекомым (10^8 клеток бактерий на личинку). Активность фагоцитоза определяли через час после инъекции бактериальных клеток. Для этого выделяли гемолимфу и подготавливали суспензию гемоцитов. После третьего цикла центрифугирования гемоцитов в АК, надосадочную жидкость удаляли, а клетки ресуспензировали в HEPES буфере (pH 7.2, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose, 10 mM) (Досон и др., 1991). Далее гемоциты наносили на чистое стекло и помещали во влажную камеру на 15 минут в темноте при 28°C . После инкубации полученный монослой клеток фиксировали 0.25% глутаровым альдегидом в HEPES буфере в течение 10 минут во влажной камере в темноте при 28°C . Затем

монослой гемоцитов промывали трехкратно дистиллированной водой. Для гашения внеклеточного свечения бактерий на монослой гемоцитов наносили трипановый синий (0.25% в ФБ) и анализировали монослой под микроскопом с ультрафиолетовым фильтром (Zeiss; Axioscop 40). Активность фагоцитоза выражали как процент гемоцитов, содержащих меченные бактериальные клетки, к общему количеству гемоцитов.

2.3.3.2. Определение интенсивности инкапсуляции

Для определения интенсивности инкапсуляции использовали имплантанты длиной 2 мм и диаметром 0.5 мм, изготовленные из нейлоновой нити. Имплантанты вводили в гемоцель личинок вощинной огневки через прокол в четвертом вентральном сегменте кутикулы. Через 2 часа имплантанты вынимали, фотографировали и использовали для анализа степени потемнения образовавшейся на них меланотической капсулы с использованием программы Image J (Rantala, Roff, 2006; Dubovskiy et al., 2008; Алексеев и др., 2008; Martemyanov et al., 2012 a,b; 2015 a,b; Dubovskiy et al., 2011). Толщину образовавшейся капсулы оценивали по срезам имплантантов. Срезы делали в трех местах имплантанта с помощью микротомы (Microm HM 520). Срезы химически фиксировали на поверхности предметного стекла. Для каждого имплантанта измеряли три среза в трех местах. Измерения производили на световом микроскопе Axioscope 40 с помощью программы AxioVision 40 (v4.6.3.0).

2.3.3.3. Определение активности фенолоксидаз в гемоцитах

Для определения активности фенолоксидаз в гемоцитах подготавливали суспензию гемоцитов. После третьего цикла центрифугирования гемоцитов в АК

надосадочную жидкость удаляли, а клетки ресуспензировали в ФБ. Далее гемоциты наносили на чистое стекло и помещали во влажную камеру на 15 минут в темноту при 28°C. После инкубации полученный монослой клеток фиксировали ацетоном в течение 10 минут во влажной камере в темноте при 28°C и промывали трехкратно дистиллированной водой. Далее монослой инкубировали с 100 мкл L-ДОФА (4мг/мл) в течение 40 минут во влажной камере в темноте при 28°C. После чего монослой гемоцитов вновь промывали трехкратно дистиллированной водой и анализировали под световым микроскопом (Zeiss; Axioscop 40). Клетки темной окраски считали как ФО положительные гемоциты, и ФО активность гемоцитов выражали как процент гемоцитов с ФО активностью по отношению к общему количеству клеток (Омельянчук и др., 2001; Kryukova et al., 2011).

2.3.3.4. Определение активности фенолоксидаз в плазме гемолимфы

Активность фенолоксидаз определяли, используя метод Ashida и Söderhäll (1984) с изменениями (Dubovskiy et al., 2013). Отбор гемолимфы проводили индивидуально, выделяя 5 мкл гемолимфы в 20 мкл охлажденного ФБ. Полученную суспензию центрифугировали при 4°C в течение 5 мин при 500 g. К 15 мкл супернатанта, свободного от клеток, добавляли 250 мкл 10 мМ L-ДОФА и инкубировали в темноте при 28°C в течение 30 минут, после чего измеряли оптическую плотность при 490 нм. Удельную активность фермента выражали в единицах изменения оптической плотности инкубационной смеси при 490 нм в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка (Dubovskiy et al., 2008a).

2.3.3.5. Подсчет общего количества гемоцитов в гемолимфе

Отбор гемолимфы у насекомых проводили индивидуально, 10 мкл гемолимфы разводили трехкратно в холодном АК с фенилтиомочевинной (ФТМ) (4мг/мл). Подсчет общего количества гемоцитов проводили в камере Горяева (Dubovskiý et al., 2013а; Крюков и др., 2014). Общее количество гемоцитов представляли как количество гемоцитов на 1 мл гемолимфы.

2.3.3.6. Определение лизоцим-подобной антибактериальной активности

Антибактериальную активность гемолимфы и гомогенатов кишечника определяли по описанному методу (Wojda et al., 2004). Для анализа активности в плазме гемолимфы, отбирали 10 мкл гемолимфы насекомых в 2 мкл охлажденного ФБ, содержащего ФТМ (4мг/мл). Полученную суспензию центрифугировали при 4°C в течение 5 мин при 500 g. Для определения активности в среднем кишечнике, выделяли кишечника от трех личинок в 100 мкл ФБ. Далее кишечника гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора в течение 10 секунд. Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 10 000g. Пять мкл плазмы, свободной от гемоцитов, или 5 мкл супернатанта гомогената кишечника помещали в лунку на агаризованной (1.5%) пластинке, содержащей лиофилизированные бактерии *Micrococcus lysodeikticus* (40 мг на 10 мл ФБ). Лизоцим-подобную активность гемолимфы определяли по диаметру зоны лизиса *M. lysodeikticus* и выражали как эквивалент лизоциму яичного белка (мг/мл). Для построения калибровочной кривой использовали лизоцим яичного белка (Мориг, Месснер, 1968).

2.3.3.7. Определение индекса коагуляции гемолимфы

Определение индекса коагуляции гемолимфы насекомых проводили по степени изменения концентрации красителя при инъекции раствора в гемоцель насекомых. Раствор красителя 5 мкл амарантового красного 2 % (Amaranth red), смешанного с липополисахаридами (0.5 мг/мл), инъецировали насекомым в гемоцель через третий задний вентральный сегмент кутикулы (Haine et al., 2007). Через 30 минут после инъекции через прокол в переднем вентральном сегменте кутикулы отбирали 5 мкл гемолимфы в 195 мкл ФБ с липополисахаридами. Оптическую плотность раствора определяли при 490 нм. Для построения калибровочной кривой использовали серийное разведение красителя (Haine et al., 2007).

2.3.4. Оценка активности антиоксидантной и детоксицирующей систем

2.3.4.1. Определение активности каталазы

Активность каталазы определяли спектрофотометрически при 240 нм по скорости разложения H_2O_2 (Wong et al., 1991). К 600 мкл реакционной смеси ФБ с 0.5 % H_2O_2 добавляли образец – 5 мкл гомогената кишечника и инкубировали 10 мин при 28°C. Удельную активность фермента выражали в единицах изменения оптической плотности инкубационной смеси при 240 нм в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка.

2.3.4.2. Определение активности супероксиддисмутазы

Активность СОД определяли спектрофотометрически при 560 нм по подавлению скорости восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) супероксид-анионом, образующимся в процессе окисления ксантина ксантинооксидазой (McCord, Fridovich, 1969). К 500 мкл реакционной смеси (5 мг/мл БСА, 70 мкМ

НСТ, 125 мкМ ксантина в ФБ), добавляли образец 40 мкл гомогената кишечника, после чего реакцию инициировали добавлением 80 мкл раствора ксантиноксидазы (КО) (10 мкл КО (5.87 ед. акт./мл) в 2 мл ФБ) и инкубировали при 28°C в темноте в течение 60 мин. Удельную активность фермента выражали в единицах изменения оптической плотности инкубационной смеси при 560 нм в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка.

2.3.4.3. Определение концентрации тиолсодержащих соединений

Для определения концентрации восстановленных (RSH) и окисленных (RSSR) тиолов использовали спектрофотометрический метод, основанный на окислении RSH 2-нитро 5-тиобензойной кислотой (Khramtsov et al., 1989; Khramtsov et al., 1997). RSSR предварительно разрушали до RSH 1N соляной кислотой (HCl) следующим образом: к 50 мкл гомогенатов кишечника добавляли 10 мкл 1N HCl и инкубировали в течении 20 мин при 37°C, после чего pH образца доводили до нейтральной (pH=7) водным раствором NaOH (10%). Концентрацию восстановленных RSH и общих RSH+RSSR тиолов измеряли при 412 нм после 10 мин инкубации 50 мкл образца в 500 мкл 0.1% раствора ДНТБ в ФБ при 37°C. Концентрацию RSH и RSSR определяли согласно калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой использовали восстановленный глутатион.

2.3.4.4. Определение активности глутатион-S-трансфераз

Активность ГСТ определяли спектрофотометрически при 340 нм по скорости увеличения концентрации 5-(2,4-динитрофенил)-глутатиона, продукта реакции ДНБ и восстановленного глутатиона, катализируемой ГТ (Habig et al., 1974). Инкубацию проводили при 28°C в течение 5 мин в 205 мкл ФБ, содержащем 1 мМ

глутатиона, 1 мМ ДНБ и образец 5 мкл гомогената кишечника (Zvereva et al., 2003; Мартемьянов и др., 2009; Слямова и др., 2008). Удельную активность фермента выражали в единицах изменения оптической плотности инкубационной смеси при 340 нм в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка.

2.3.4.5. Измерение концентрации малонового диальдегида

Малоновый диальдегид (МДА) является одним из продуктов процесса ПОЛ (Rael et al., 2004). Для определения концентрации МДА мы использовали тиобарбитуровую кислоту (ТБК), с которой МДА образует красный флуоресцентный продукт (Dubovskiy et al., 2008). 20 мкл 20 % трихлоруксусной кислоты смешивали с 40 мкл образца и центрифугировали при 10000 g 10 мин (+4°C). 50 мкл супернатанта смешивали с 150 мкл водного раствора ТБК (0.8 %) и инкубировали при +100°C 60 мин. Комплекс ТБК-МДА, образуемый в процессе реакции, измеряли фотометрически при 535 нм и флуометрически (Ex/Em = 532/553 нм). Концентрация МДА представлена в нМ МДА на мг белка (Dubovskiy et al., 2008b; Butt et al., 2013). В качестве стандарта использован 1,1,3,3-тетраметоксипропан.

2.3.4.6. Оценка генерации активированных кислородных метаболитов

Генерация АКМ в кишечнике была измерена при помощи стандартной широко распространенной методики, основанной на реакции активированных кислородных и нитроксильных радикалов с 2',7'-дигидроксифлуорисцеином (DCFH₂) (Chen et al., 2010; Butt et al., 2013). 5 мкл образца смешивали с 200 мкл раствора DCFH₂ в ФБ (10 мкМ) и инкубировали 30 мин при 37°C. Интенсивность образования продукта реакции измеряли флуометрически (Ex/Em = 485/530 нм). Генерацию АКМ рассчитывали как уровень флуоресценции ((Ft₃₀ -

F_{t_0}), где $F_{t_{30}}$ = флуоресценция через 30 мин после начала реакции, а F_{t_0} = f_0 флуоресценция в начале 0 мин) на мг белка.

2.3.5. Определение концентрации белка

Концентрацию белка в образцах определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1986). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин (БСА).

2.3.6. Оценка уровня экспрессии различных генов в кишечнике, жировом теле и покровах насекомых

Для исследования были выбраны 21 генов-мишеней. Кодированные антимикробные пептиды: галлеримицин, галиомицин, гловерин, цекропин-Д, 6-Тох; ингибитор металлопротеиназы насекомых (IMPI); трансферрин. Шапероны: белок теплового шока 90 (БТШ 90), 7GM контиг 21310, контиг 1489. Факторы роста и цитокины: контиг 704, контиг 233. Глутатион пероксидазу (контиг 17373) и пероксиредоксин (контиг 03093). Регуляторы апоптоза, иммунного ответа и воспалительных процессов: 2GM контиг 20004, 6GM контиг 5976, контиг 15265, контиг 14880, контиг 20582, контиг 15362, контиг 19932. В качестве референсных использовались гены внутреннего контроля 18S рРНК (18S rRNA; AF286298) и фактора элонгации трансляции 1 альфа (Elongation Factor 1-alpha, Ef-1a; AF423811). Подробная информация находится в приложении (приложение 1).

Для нормализации образцов по количеству кДНК проводили ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) референсных генов с использованием 1/50 объема каждого образца, после чего количество кДНК рассчитывали по стандартной (или калибровочной) кривой, и исходные образцы доводили до идентичной концентрации. Качество полученных образцов также проверялось по

соответствию полученных значений между двумя используемыми референсными генами: *18S rRNA* (AF286298) и *Ef-1a* (AF423811).

Дизайн праймеров проводили на основе опубликованных в NCBI последовательностей *G. mellonella*, а также последовательностей EST-библиотеки *G. mellonella* (Vogel et al., 2011), кодирующих высоко гомологичные последовательности белков. В случае гена БТШ90, обратный праймер комплементарен консервативной 3'-нетранслируемой области, описанной для Lepidoptera (Xu et al., 2012), тогда как вырожденный прямой праймер подобран по выравниванию 8-ми кодирующих последовательностей генов БТШ90 чешуекрылых (GU230738, AB214972, AB060275, EF197936, GU230737, AF254880, GU230739, AB206477) с помощью веб-инструмента CODEHOP (Staheli et al., 2011). Праймеры к остальным генам подбирали с использованием программ PerlPrimer (Marshall, 2004) и Primer3 (Rozen, Skaletsky, 2000).

Аmplификацию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл Rotor-Gene SYBR Green PCR mix, 1 мкл соответствующей пары праймеров и 4 мкл кДНК. Для проведения реакции использовали амплификатор Rotor-Gene при следующем температурном режиме: начальная денатурация, 95°C 5 мин; 42 цикла - денатурация, 95°C 5 с; отжиг, 60°C 10 с; элонгация, 72°C 20 с; детекция, 80°C 5 с. Для повышения специфичности ПЦР первые пять циклов проводили в режиме ступенчатой ПЦР (touchdown) от 65°C с шагом 1°C/цикл. Для проверки специфичности и эффективности амплификации по окончании каждой серии реакций проводили HRM-анализ кривых плавления конечных продуктов ПЦР от 69°C до 95°C с инкрементом 0.5°C.

Все реакции проводились в трех повторах, и оптимальные пороговые значения C_t и эффективности амплификации рассчитывались по 7 точкам серийных разведений объединенной кДНК из насекомых, зараженных бактериями. Значения кратности изменений (fold change) рассчитывали методом $\Delta\Delta C_t$. $\Delta\Delta C_t$ затем конвертировали в относительное число копий транскрипта,

соответствующее выражению $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Далее в тексте приведены значения, полученные методом $\Delta\Delta C_t$ при использовании референсного гена *Ef-1a*.

2.3.7. Подавление экспрессии (сайленсинг) различных генов защитной системы с помощью РНК интерференции

Для блокирования генов кодирующих IMP1, гловерин и FRx был использован подход по избирательному подавлению экспрессии гена-мишени на стадии транскрипции или трансляции при помощи малых молекул РНК. Для запуска процесса РНК-интерференции были использованы 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. Фрагменты для синтеза дцРНК IMP1, гловерина и FRx, а также их праймеры представлены в приложении (приложение 2) соответственно. ДНК матрицы для синтеза РНК были получены с помощью праймеров с фрагментами для связывания T7 полимеразы. Соответствие ДНК «матриц» для синтеза РНК требуемым фрагментам проверяли с помощью секвенирования. Синтез длинных дцРНК проводилась с помощью набора реагентов MEGAscript® T7 Transcription Kit. Очистку выполняли с помощью MEGAclean™ Transcription Clean-Up Kit. Синтезированные дцРНК IMP1, гловерина и FRx инъецировали в гемоцель личинок вощинной огневки 4 возраста (в 3 мкл ФБ): 100нг на личинку для гловерина и FRx, 1000 нг на личинку для IMP1 за сутки перед заражением ЛК⁵⁰ бактерий БТ. В качестве контроля использовали дцРНК GFP (green fluorescent protein). Уровень подавления экспрессии генов мишеней контролировали с помощью ПЦР-РВ.

2.4. Измерение показателей индивидуального развития насекомых и популяционных характеристик

В качестве показателей индивидуального развития насекомых и популяционных характеристик были измерены: выживаемость насекомых от стадии яйца до стадии имаго, время развития насекомого от стадии яйца до стадии имаго, вес куколок самцов и самок, плодовитость. Пол насекомого определялся после выхода бабочки из куколки. Плодовитость определяли по количеству яиц полученной от одной пары в течении пяти дней при парном ссаживании.

2.5. Реактивы

В экспериментах использовали реактивы ведущих мировых производителей Ambion, Invitrogen, Promega, Quanta Bioscience, Serva, ICN, Sigma.

2.6. Статистическая обработка данных

Полученные данные обрабатывали статистически, рассчитывая среднее арифметическое и его ошибку (Доспехов, 1985). 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. Для анализа уровня резистентности селектированной к БТ и меланистической линии использовали коэффициент резистентности (RR от resistance ratio) – частное при делении ЛК50 устойчивой линии на ЛК50 восприимчивой (контрольной) линии (Tabashnik et al., 2012). Статистическую значимость различий изучаемых

параметров для данных с не нормальным распределением определяли с помощью теста Тест Мана-Уитни (Mann–Whitney U-test) и однофакторный дисперсионный анализ 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.

Подробная информация по количеству насекомых в каждом эксперименте, нормальности распределения данных и применяемого метода анализа находится в приложении (приложение 3).

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

Необходимо отметить, что естественный путь проникновения БТ в организм насекомых – пероральный (Vallet-Gely et al., 2008; Nielsen-LeRoux et al., 2012), соответственно первичный барьер на пути данного патогенна – это кишечник. Принято считать, что основной вклад в развитие патогенеза БТ вносят Сгу-токсины (Pigott, Ellar, 2007). При попадании в кишечник насекомых происходит растворение белкового кристалла БТ под действием щелочных условий до протоксинов, затем активация токсинов протеолитическими ферментами кишечника, после чего активированные Сгу-токсины связываются с рецепторами на поверхности эпителиальных клеток кишечника хозяина, что приводит к образованию пор в клетке-мешени и ее последующей гибели (Bravo et al., 2005; Jurat-Fuentes et al., 2006). На данном этапе инфекции, устойчивость насекомых могут определять нарушения при растворении кристалла и активации протоксина (Oppert et al., 1994), и, конечно, мутации в генах кодирующих рецепторы к токсинам БТ на поверхности эпителиальных клеток (Gahan et al., 2001; Darboux et al., 2002).

При частом контакте насекомых с бактериями БТ и особенно Сгу-токсинами, у насекомых может возникать устойчивость к БТ. Наиболее ярко это явление было продемонстрировано на трансгенных растениях, в которые внедряли один или два гена Сгу-токсинов. Большой объем данных исследований привел к формированию моногенной теории эволюции резистентности к БТ. В частности, установлено, что устойчивость к БТ определяется мутациями аминопептидаз, кадеринов и щелочных фосфатаз, которые являются рецепторами для Сгу-токсинов (de Maagd et al., 2003). Однако эти данные были получены для насекомых, имеющих значительные (100-1000 кратные) увеличения резистентности к дельтаэндотоксину БТ, возникшие в результате 5-7 летнего, очень «жесткого» отбора под действием Сгу-токсина, синтезируемого

трансгенными растениями или коммерческих БТ препаратов (Ferre, Van Rie, 2002). Эволюция резистентности насекомых к БТ на ранних этапах отбора, при повышении устойчивости в 5-20 раз практически не изучена.

Следует отметить, что вегетативные клетки БТ синтезируют ряд токсинов необходимых для развития инфекционного процесса (Nielsen-LeRoux et al., 2012). Сту-токсины, гемолизины, VIP белки и фосфолипазы БТ воздействуют на мембраны клеток, что приводит к нарушению их свойств. Данные процессы могут быть сопряжены с увеличением процессов ПОЛ и, как следствие, с выбросом АКМ. Защитой от данных высокореактивных продуктов может выступать антиоксидантная система. Вне всякого сомнения, существенную роль в защите от повреждения клеток под действием токсинов БТ будут играть репарационные и регенерационные процессы в организме насекомых. Кроме того, существенное значение в формировании резистентности к БТ может играть содержимое кишечника. Это относится к видовому составу микрофлоры и ее метаболитов, обладающих бактериостатическими свойствами. В том числе, веществ непосредственно синтезируемых эпителиальными клетками кишечника и способных влиять на вегетативные клетки БТ. Среди таких веществ следует отметить компоненты иммунной системы (АМБ, ФО, АКМ и т.п.) (Kwon, Kim, 2007; Broderick et al., 2010; Richards, Dani, 2010; Shrestha et al., 2010). Однако, до конца не известно, каков же вклад реакций клеточного и гуморального иммунитета в защите от бактериальной инфекции. Каково значение иммунных реакций и регенерации тканей в кишечнике при формировании устойчивости к БТ. Мы предполагаем, что клеточные иммунные реакции и антимикробные белки могут защищать насекомых на ранних этапах бактериоза. Но не ясно, наблюдаются ли адаптивные изменения компонентов иммунной системы при развитии резистентности насекомых к БТ в ходе микроэволюции.

В данной главе представлены результаты собственных исследований защитных систем воцинной огневки при бактериальной инфекции БТ, а также при развитии резистентности к БТ. В ходе исследований был использован

сравнительный анализ иммунного ответа при бактериозе, при помощи различных доз патогена, приводящих как к острой, так и сублетальной инфекции. Анализировались защитные реакции на разных стадиях патогенеза и в различных органах. Кроме того, для понимания микроэволюционных процессов при взаимоотношениях в системе насекомое-патоген был использован направленный отбор вошинной огневки по принципу устойчивости к БТ.

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

Сублетальное и полулетальное заражение насекомых

Для сравнительного анализа иммунного ответа мы моделировали сублетальную (ЛК15) и полулетальную (ЛК50) кишечную инфекцию, для чего насекомых заражали различными концентрациями споро-кристаллической смеси бактерий *Bacillus thuringiensis* (БТ) *ssp.galleriae* (рисунок 1). Основную гибель насекомых наблюдали в течение первых трех дней после инфицирования, как при ЛК15, так и при ЛК50. При скармливании насекомым сублетальной дозы бактерий БТ на первые сутки гибель составляла $2.3 \pm 0.7\%$, в последующие два дня гибель была $9.4 \pm 1.5\%$ и $2.2 \pm 0.4\%$, соответственно. При заражении насекомых полулетальной дозой БТ на первые сутки гибель составила $12 \pm 3\%$, на вторые $25 \pm 1\%$ и третьи сутки $8 \pm 3\%$. В контрольных вариантах гибель отсутствовала (рисунок 1).

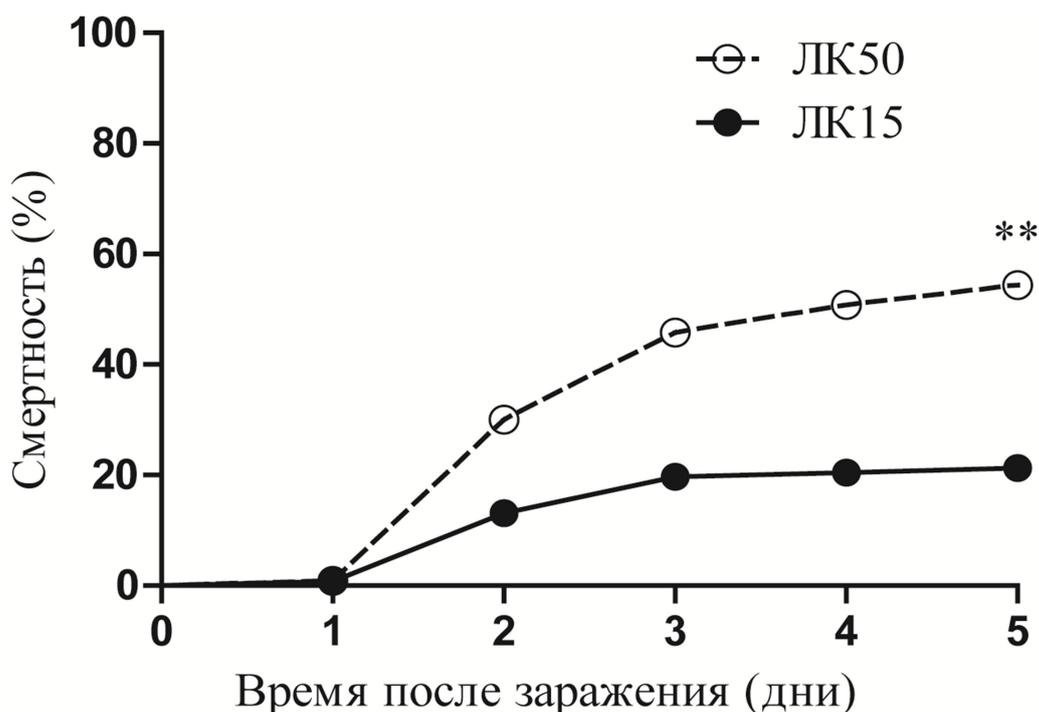


Рисунок 1. Смертность личинок *G. mellonella* при заражении бактериями *B. thuringiensis* сублетальной (ЛК15) и полублетальной (ЛК50) концентраций (** $p < 0,01$ по сравнению с контролем, $n=200$ на вариант).

Динамика смертности при бактериозе

Анализ динамики смертности при бактериозе необходим для разделения патогенеза на различные этапы. В частности, для оценки вклада тех или иных защитных систем насекомых в развитие инфекционного процесса необходимо выделять начальные, острые, хронические этапы болезни, а также выздоровление. При сублетальном бактериозе такие этапы достаточно сложно выделить, так как смертность насекомых равномерно распределена по всем пяти дням эксперимента. Однако, при развитии полублетального бактериоза БТ наибольшая смертность была отмечена на первые сутки после заражения ЛК50 ($30 \pm 2.1\%$, $p < 0.001$) (рисунок 2). На вторые сутки смертность была уже меньше и составляла $15 \pm 2.5\%$ ($p < 0.001$) (рисунок 2). На третьи сутки смертность практически

отсутствовала $0.6 \pm 0.6 \%$ ($p < 0.001$) (рисунок 2). У не зараженных БТ насекомых контрольного варианта смертность не отмечали. Наши данные свидетельствуют, что острая стадия бактериоза у воцинной огневки *G. mellonella* проходит в первые 24 часа после заражения. С этим связана высокая смертность на первый день бактериоза.

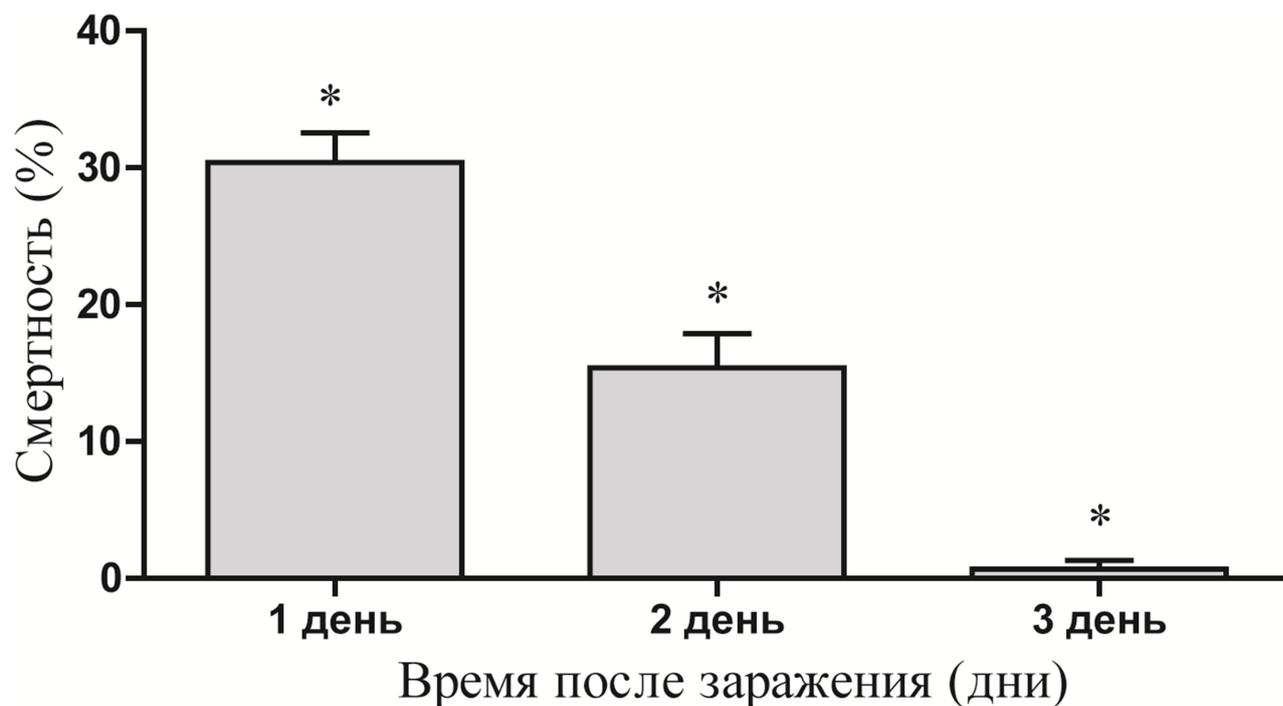


Рисунок 2. Смертность личинок воцинной огневки при заражении бактериями БТ (ЛК50) (*- $p < 0.05$ по сравнению с остальными вариантами, $n=200$ на вариант).

Создание устойчивых к БТ линий насекомых

Для создания линии насекомых с повышенной устойчивостью к бактериям БТ была проведена селекция воцинной огневки (20 поколений), по так называемому принципу устойчивости к бактериям. Мы отбирали насекомых выживших после полулетального заражения БТ и получали последующие поколения для дальнейшего раунда отбора. Было установлено, что устойчивость селектированных насекомых 20-го поколения достоверно выше ($p < 0.05$), чем у

насекомых контрольной линии (рисунок 3). Отмечено, что устойчивость начала формироваться с пятого поколения (рисунок 4). Коэффициент резистентности (RR) насекомых селектированной линии F20 составил 8.8, то есть она была практически в 9 раз устойчивее контрольной линии. Также мы установили, что восприимчивость к БТ не возвращается у селектированной линии даже после трех поколений без действия фактора отбора (рисунок 5).

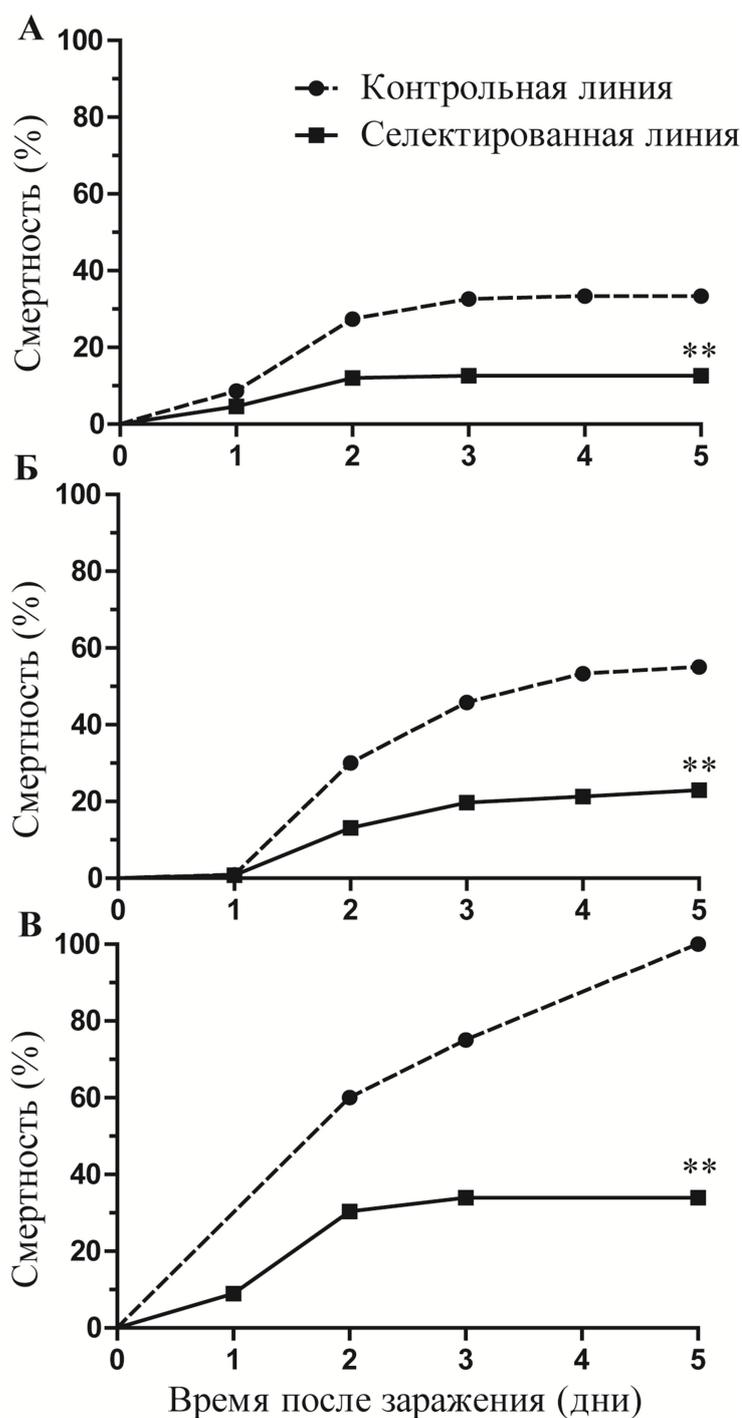


Рисунок 3. Восприимчивость личинок *G. mellonella* 20-го поколения селективных на устойчивость к бактериям *B. thuringiensis* при бактериозе (А, сублетальное заражение (ЛК15), Б, полублетальное заражение (ЛК50), В, летальное заражение (ЛК90) (** $p < 0,01$ по сравнению с контролем, $n=200$ на вариант).

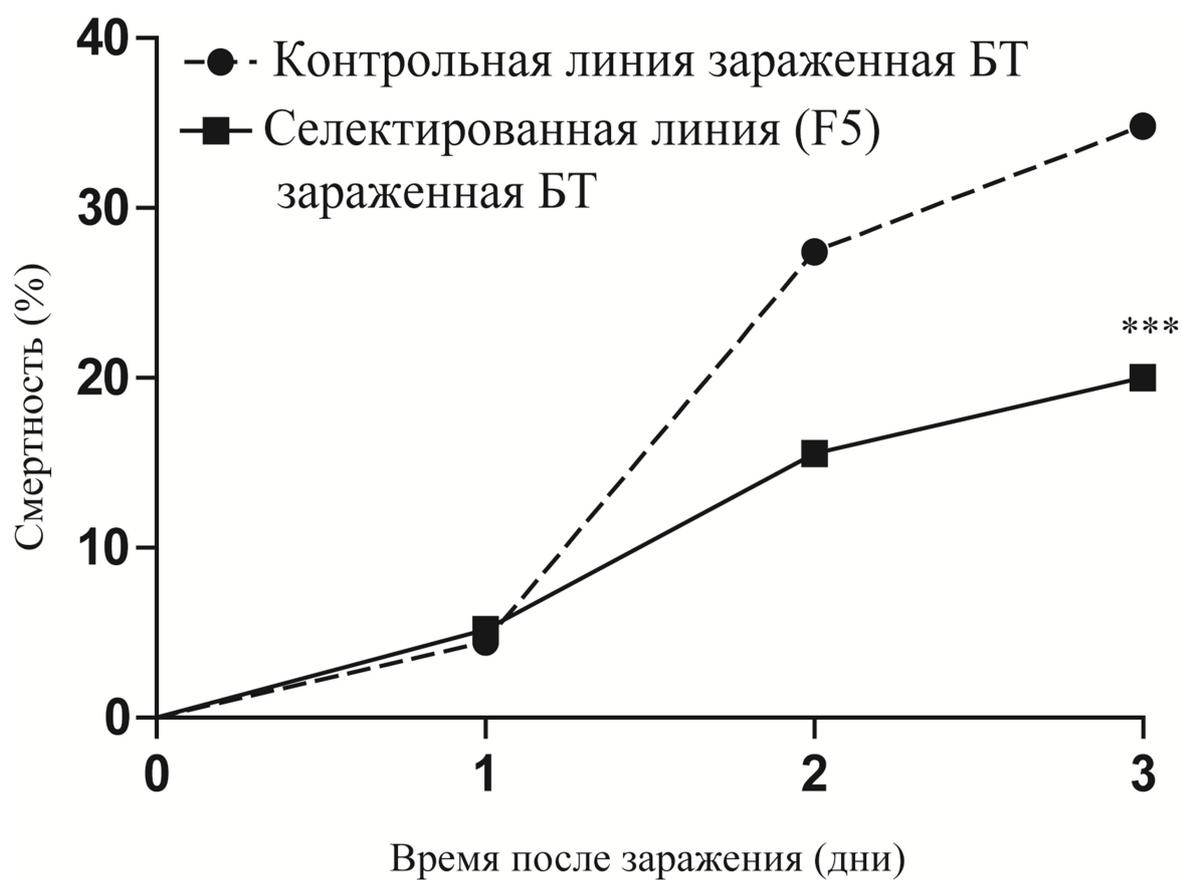


Рисунок 4. Смертность насекомых селектированной к *B. thuringiensis* линии пятого поколения (F5) и контрольной линии при заражении бактериями *B. thuringiensis* ЛК50 (***) $p < 0.001$ по сравнению с контролем, $n=200$ на вариант).

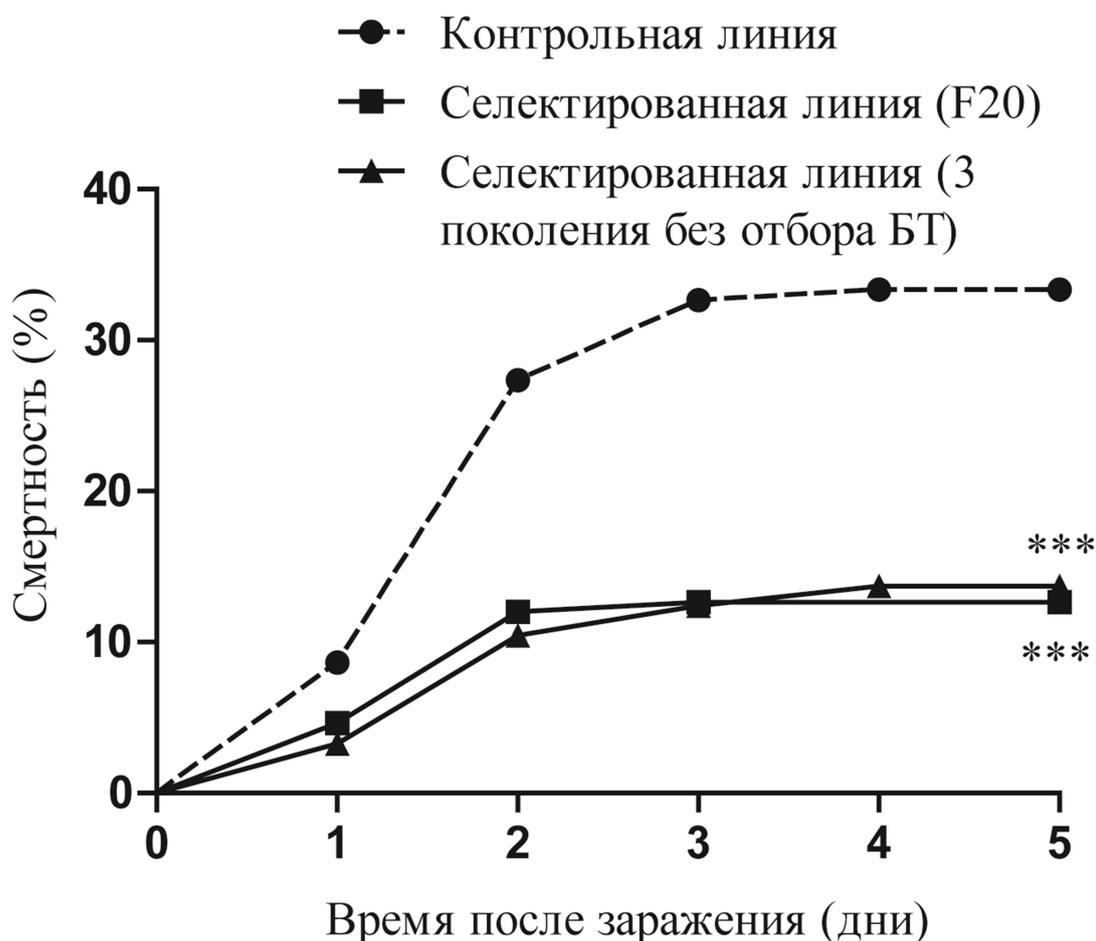


Рисунок 5. Смертность насекомых селектированной к *B. thuringiensis* (БТ) линии, контрольной линии и селектированной линии оставленной без отбора бактериями БТ на три поколения (***) $p < 0.001$ по сравнению с контролем, $n=200$ на вариант).

Таким образом, были получены модели, позволяющие проводить комплексные сравнительные исследования иммунного ответа при бактериозе, а также защитных механизмов, принимающих участие в формировании резистентности к БТ. На данных модельных системах был проведен комплекс исследований физиологических, биохимических и молекулярных систем, принимающих участие в формировании защитной стратегии насекомых против бактерий.

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

Общеизвестно, что ряд морфометрических и популяционных показателей (вес, плодовитость, время развития и т.п.) могут выступать интегральными показателями состояния организма и популяции насекомых. Мы провели оценку данных показателей у вошинной огневки при развитии устойчивости к БТ.

Вес куколок самцов и самок насекомых устойчивой линии был выше, чем у насекомых восприимчивой линии ($p < 0.05$, $p < 0.001$) (Рисунок 6, А). Плодовитость имаго также была выше у насекомых устойчивой линии ($p < 0.05$) (Рисунок 6, Б).

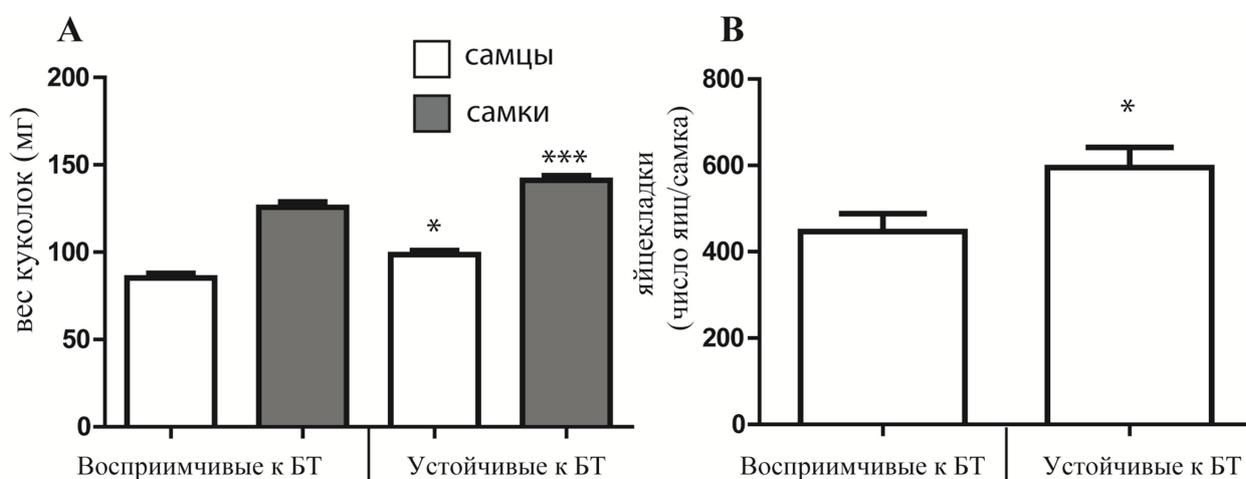


Рисунок 6. Вес куколок (А) и плодовитость (Б) у линий вошинной огневки восприимчивой (контрольной) и устойчивой (селектированной на устойчивость, F20) к БТ (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ по сравнению с восприимчивой линией того же пола, $n=100$ на вариант).

Полученные данные свидетельствуют, что повышение устойчивости к БТ у вошинной огневки к 20 поколению не привело к снижению плодовитости или веса куколок. Отмечено даже небольшое достоверное, 15-20 %, увеличение ($p < 0.05$). Снижение индивидуальных морфометрических (вес, размер и т.п.) и популяционных (плодовитость, смертность) показателей насекомых устойчивых к БТ чаще всего происходит при формировании очень высоких уровней резистентности (два-три порядка) (Gassmann et al., 2009). Большинство случаев снижения индивидуальных и популяционных показателей описано для насекомых, у которых происходят мутации белков-рецепторов к БТ (кадерин, аминопептидазы, щелочные фосфатазы) (Gould, Anderson, 1991; Carriere et al., 2005). Вероятно, мутации важнейших ферментов пищеварения и структурных белков – кадеринов могут негативно сказываться в целом на физиологических процессах (Gassmann et al., 2009). Однако, существуют исследования, в которых формирование устойчивости к БТ не коррелировало со снижением веса и выживаемости насекомых (Gassmann et al., 2009). Чаще всего это сопряжено с не большими уровнями устойчивости к БТ. Возможно, на ранних этапах селекции и/или при отсутствии "жесткого" давления фактора отбора, не происходит закрепление мутаций рецепторов к Cry-токсинам и как следствие снижения морфометрических показателей.

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

Растворение токсина, его активация и связывание с рецепторами на поверхности эпителиальных клеток является начальным и наиболее важным этапом патогенеза БТ. Растворение токсина происходит в щелочной среде кишечника, после чего необходима активация протоксина протеазами (Orperg, 1999). Мы установили, что у устойчивых насекомых в 13 раз повышен уровень экспрессии индуцибельного ингибитора металлопротеаз (IMPI) по сравнению с восприимчивыми (рисунок 7). Более того, его экспрессия увеличивается при

заражении бактериями БТ (рисунок 7). В частности, ІМРІ был повышен у насекомых восприимчивой линии в жировом теле и кишечнике в 5 и 70 раз соответственно. У насекомых устойчивой линии уровень экспрессии ІМРІ в жировом теле и кишечнике при бактериозе БТ в дозе ЛК50, повышался в 2 и 10 раз соответственно (рисунок 7 А, Б). Следует отметить, что повышенный базовый уровень экспрессии ІМРІ в кишечнике и жировом теле устойчивых насекомых по сравнению с восприимчивыми при бактериозе оставался на высоком уровне в жировом теле но не в кишечнике (рисунок 7 А, Б).

Базовый уровень экспрессии ІМРІ очень важен на начальных этапах активации токсина, так как данный ингибитор может блокировать протеолиз протоксинов БТ и следовательно снижать концентрацию активированного токсина.

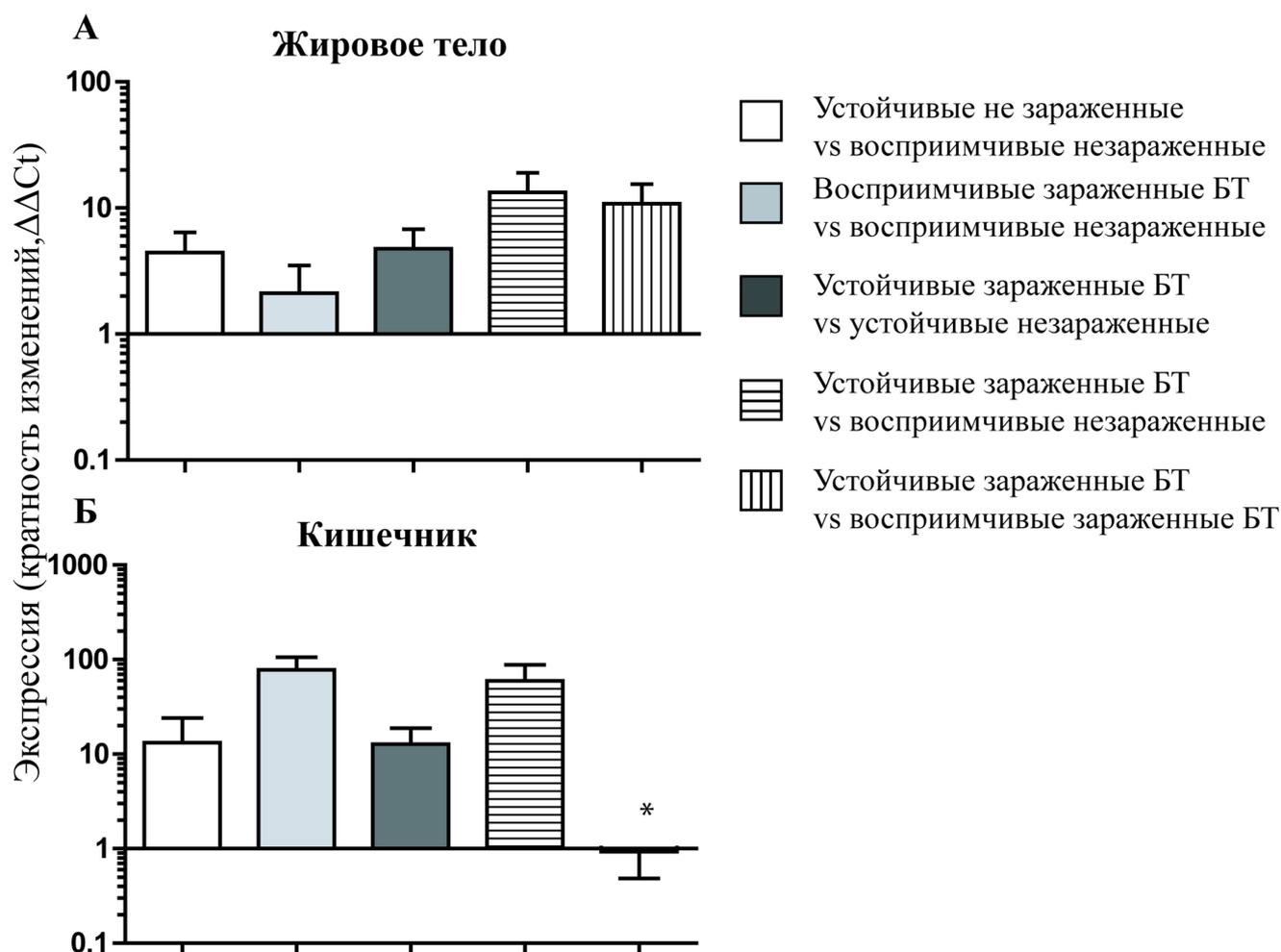


Рисунок 7. Уровень экспрессии индуцибельного ингибитора металлопротеаз в кишечнике и жировом теле у селектированной линии (устойчивые к БТ) и контрольной линии (восприимчивые к *B. thuringiensis* (БТ)) нативных и зараженных ЛК50 БТ личинок воцинной огневки на второй день инфекции (* $p < 0.05$ по сравнению с остальными вариантами, $n=3$ на вариант).

Сайленсинг *IMP1* у личинок воцинной огневки при заражении БТ

Для более детального анализа вклада *IMP1* в защиту против бактериальной инфекции, мы провели эксперимент с подавлением экспрессии (сайленсингом) *IMP1*. Сайленсинг генов на посттранскрипционном уровне является результатом разрушения (деградации) мРНК соответствующих генов. Разрушение мРНК

препятствует трансляции и формированию продукта гена (обычно, полипептида, белка). Общий механизм посттранскрипционного сайленсинга генов это РНК-интерференции (RNAi) - путь с применением интерферирующей дцРНК синтезированной для определенного гена. Было установлено, что сайленсинг IMP1 приводит к достоверному увеличению смертности насекомых при бактериальной инфекции БТ (рисунок 8). Это доказывает защитную роль данного ингибитора протеаз при бактериозе. Мы предполагаем, что уровень экспрессии IMP1 будет существенно сказываться на активации протоксина БТ и/или его связывание с эпителиальными рецепторами, такими как металлсодержащие протеазы - аминокпептидазы. Более того, следует отметить, что IMP1 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).

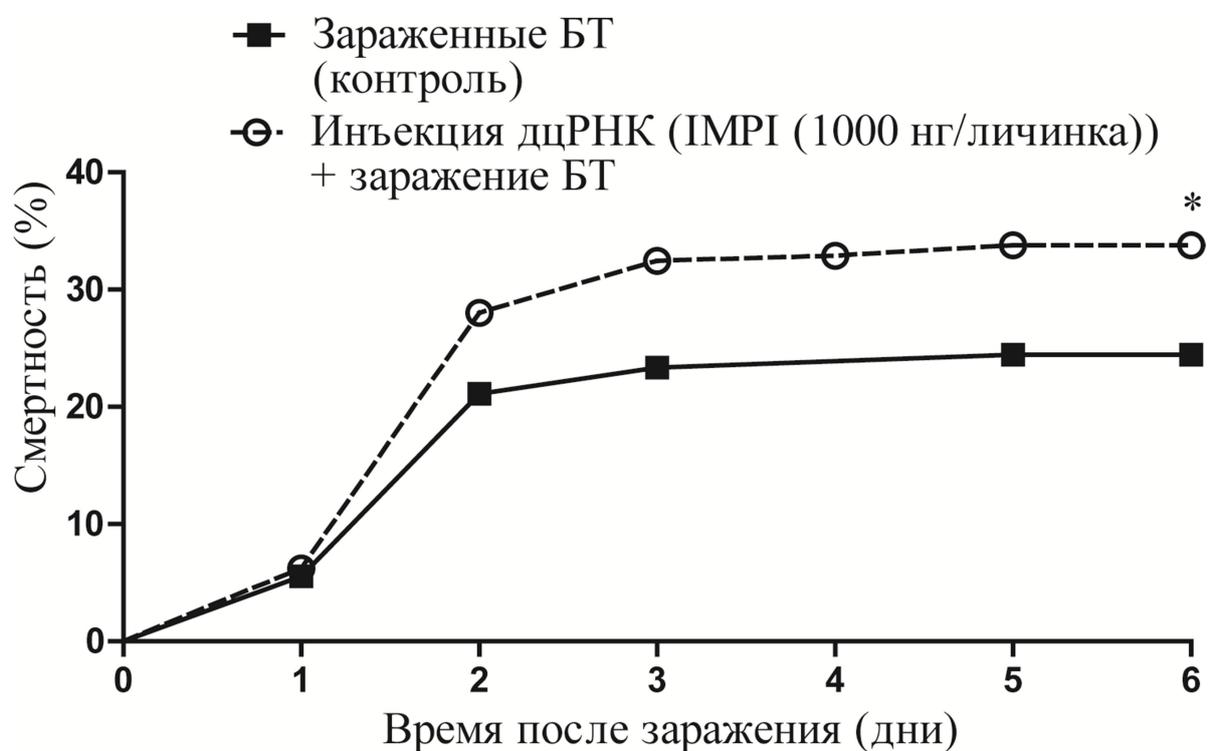


Рисунок 8. Смертность личинок вошинной огневки при заражении *B. thuringiensis* (БТ) после инъекции физраствора и интерферирующей дцРНК-IMP1 (* $p < 0.05$ по сравнению с инъекцией физраствора, $n=150$ на вариант).

Активность аминопептидаз и щелочных фосфатаз в кишечнике насекомых селектированных на устойчивость к БТ

Мы установили, что у устойчивых к БТ насекомых (селектированная линия) достоверно ниже активность аминопептидаз и щелочных фосфатаз в микроворсинках кишечника (рисунок 9, А, Б). Известно, что данные ферменты являются рецепторами для токсинов БТ (Griffitts, Aroian, 2005). Снижение их активности у устойчивых к БТ насекомых может быть связано с изменением их структуры и/или снижением экспрессии, а также ингибированием за счет регуляторных молекул. Известно, что IMP1 может связываться с аминопептидазами. При этом IMP1 будет блокировать активный центр фермента и соответственно нарушать его контакт с C₁у белками БТ. Таким образом, снижение активности аминопептидаз на поверхности эпителиальных клеток устойчивых насекомых может приводить к снижению уровня связывания эндотоксина БТ в кишечнике и являться одной из причин повышения устойчивости насекомых к БТ.

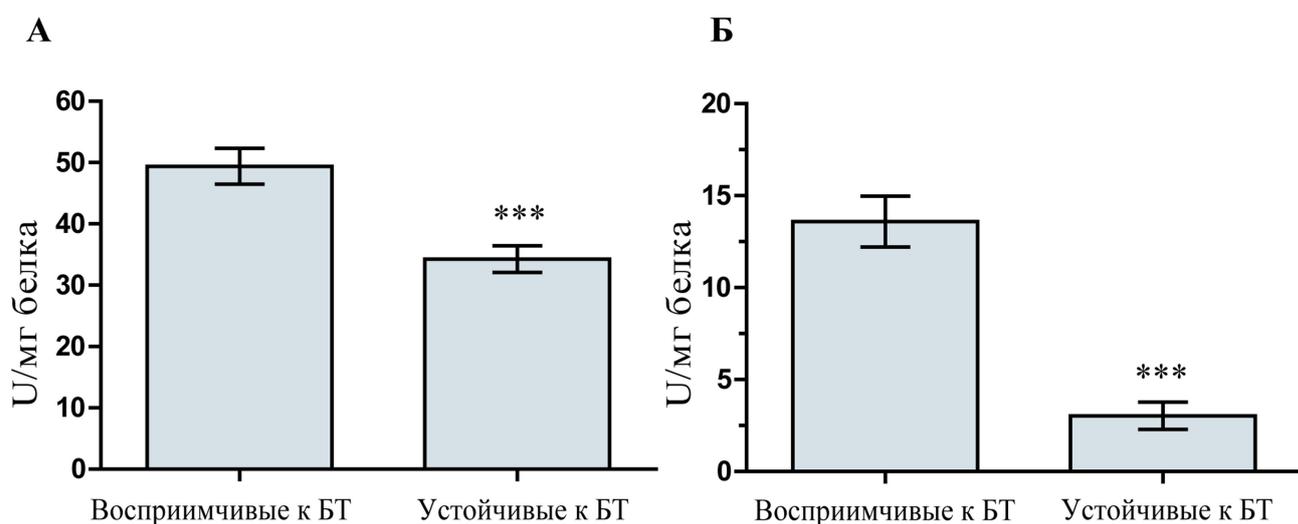


Рисунок 9. Активность аминопептидаз-N (А) и щелочных фосфатаз (Б) в эпителиальных клетках кишечника у селектированной линии (устойчивые к *B. thuringiensis* (БТ)) и контрольной линии (восприимчивые к БТ) насекомых (***) $p < 0.001$ по сравнению с восприимчивой линией, $n=50$ на вариант).

Активирование токсина в результате ограниченного протеолиза является одним из ключевых этапов действия токсина. Следовательно, изменение состава протеаз, повышение или снижение их активности в кишечнике, может приводить к чрезмерному или недостаточному расщеплению протоксина, соответственно, не будет происходить активации токсина. Подобные изменения в активировании токсина показаны в исследовательских работах на примере личинок амбарной огневки *Plodia interpunctella* и хлопковой совки *Heliothis virescens*, устойчивых к бактериям БТ (Oppert et al., 1994; Forcada et al., 1996, 1999). Так, на линиях насекомых, устойчивых к бактериям БТ, установлено, что одним из механизмов формирования резистентности к БТ является снижение активности трипсин-подобных протеаз, активирующих протоксин, модификации рецепторов эпителиальных клеток кишечника, связывающих токсин бактерий, а также снижение концентрации рецепторов на мембранах клеток (Ferre, Van Rie, 2002; Candas et al., 2003; Ma et al., 2005). Мы установили, что у устойчивой к БТ воцинной огневки происходят схожие изменения ферментов-рецепторов токсина в кишечнике. Снижение активности данных ферментов может свидетельствовать как о некоторых изменениях в их структуре, так и в снижении их концентрации. Кроме того, мы впервые установили, что одним из возможных механизмов резистентности к БТ выступает ИМРІ. Данный ингибитор может снижать уровень протеолитической активации протоксина БТ или нарушать связывание активированного Сru токсина с поверхностью мембран эпителиальных клеток кишечника.

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

После активации дельтатоксина БТ и связывания Сгу белков 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 репарационные процессы, которые определяют целостность кишечника и сохранение функциональной активности эпителиальных клеток. Об уровне репарационных процессов можно судить по экспрессии ряда контигов, которые относятся к факторам роста и цитокинам (growth-blocking peptide, pleiotrophin-like protein, plasmatocyte-spreading peptide) (Vogel et al., 2011). Мы установили, что насекомые линии устойчивой к БТ имеют повышенный базовый уровень экспрессии ряда контигов (703 и 233) в кишечнике по сравнению с насекомыми восприимчивой линии (рисунок 10, Б). При этом развитие бактериоза БТ сопровождается увеличением экспрессии контига 703 и контига 233 в жировом теле и кишечнике насекомых, как устойчивой линии, так и восприимчивой (рисунок 10, А, Б).

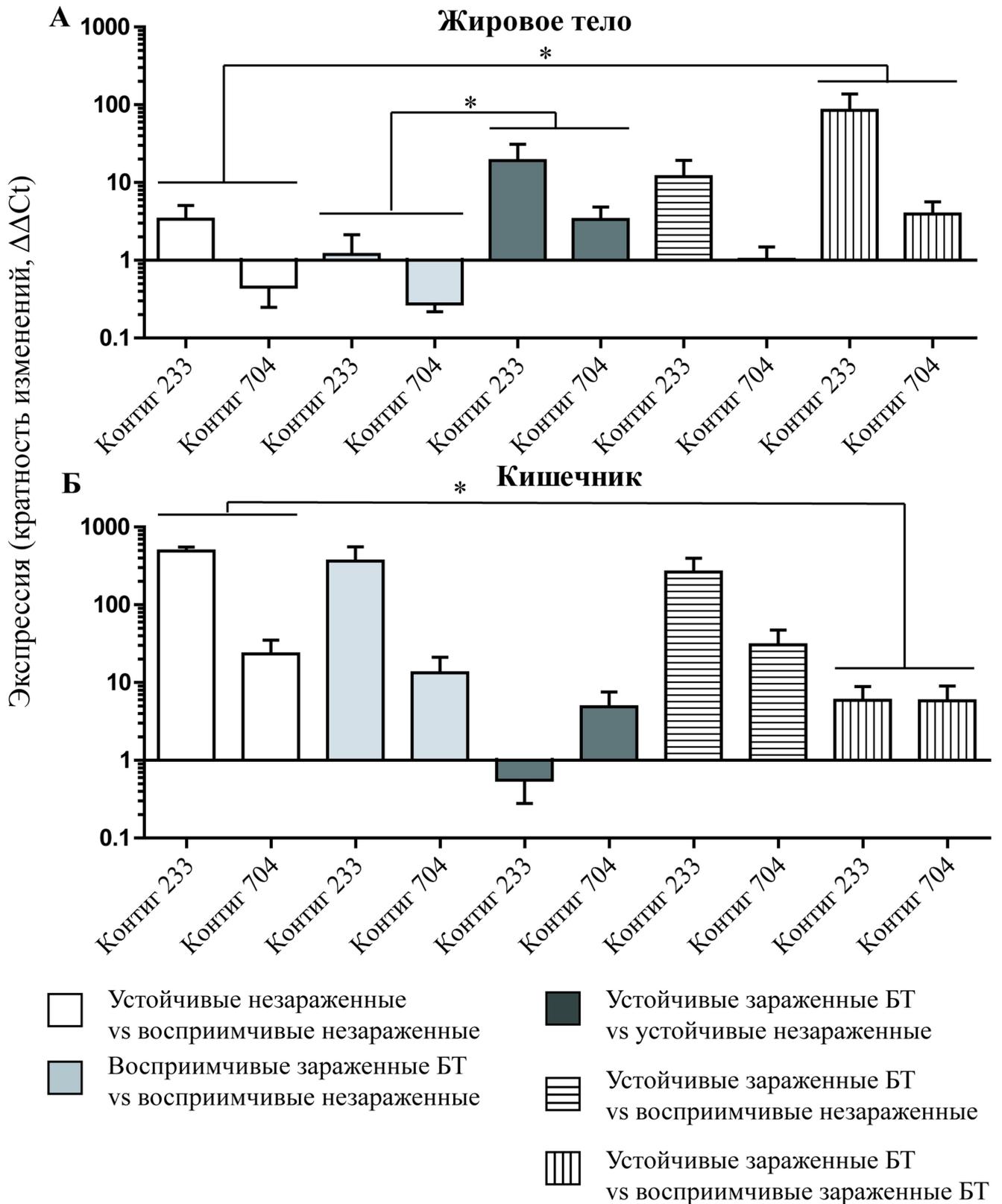


Рисунок 10. Уровень экспрессии факторов репарации и регенерации в кишечнике и жировом теле у селектированной линии (устойчивые к *B. thuringiensis* (БТ)) и контрольной линии (восприимчивые к БТ) нативных и зараженных ЛК50 БТ личинок воцинной огневки на второй день инфекции (* $p < 0.05$, $n = 3$ на вариант).

Активная пролиферация, рассматривается как важный фактор защиты *Heliothis virescens* против Cry белков (Martinez-Ramirez et al., 1999; Loeb et al., 2001). Однако следует отметить, что такой механизм устойчивости эффективен при низком уровне инфекционной нагрузки (Hernández-Martínez et al., 2010). Более того, наши данные подтверждаются исследованиями, выполненными на *Drosophila* (Buchon et al., 2010). В этой работе показано, что активная пролиферация эпителиальных клеток может защищать насекомых от пероральной бактериальной инфекции *Erwinia*. Таким образом, наши данные поддерживают гипотезу о том, что активная пролиферация и регенерация эпителия может быть одной из ключевых адаптаций насекомых к БТ.

3.5. Иммуный ответ насекомых при бактериозе *B. thuringiensis*

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

Для установления роли реакций клеточного и гуморального иммунитета при развитии бактериальной инфекции БТ у насекомых мы провели сравнительное исследование реакций иммунной системы у личинок вошинной огневки при бактериальном заражении. Комплексное исследование включало анализ динамики изменений активности защитных реакций в течении 3 суток, заражение различными дозами бактерий, изучение ответа в различных тканях и органах (гемолимфа, жировое тело, кишечник).

Общее число гемоцитов

Концентрация гемоцитов в гемолимфе нативных личинок вошинной огневки составляла 2.7×10^7 ($\pm 1.2 \times 10^6$) на мл. Сублетальное заражение БТ приводило к достоверному снижению общего числа гемоцитов (ОЧГ) на третий день ($p \leq 0.001$) по сравнению с контролем. ОЧГ достоверно снижалось на второй ($p = 0.045$) и третий ($p = 0.016$) дни при заражении насекомых ЛК50 (рисунок 11).

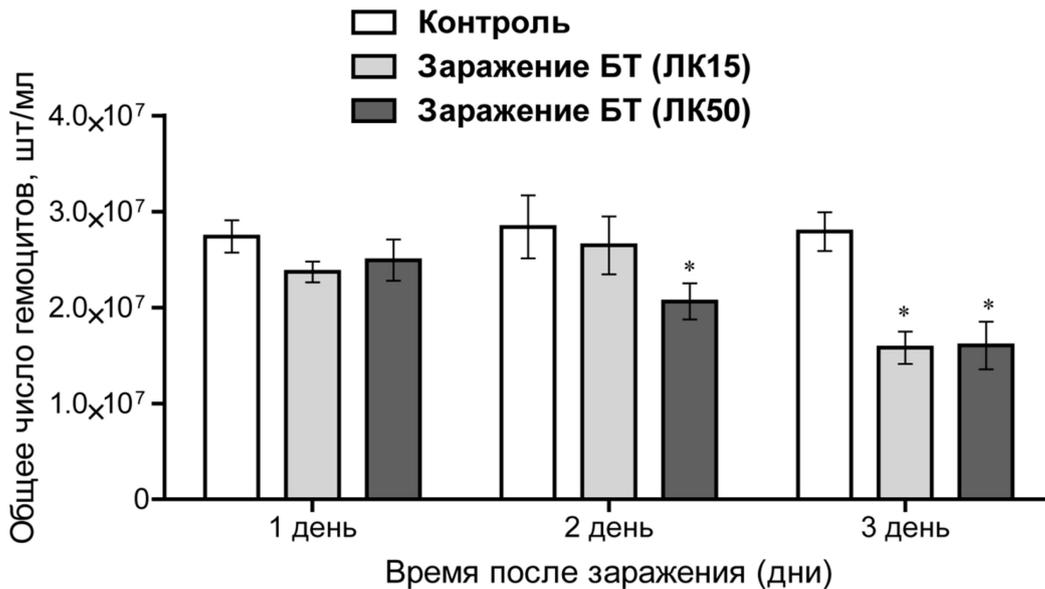


Рисунок 11. Общее число гемоцитов у личинок *G. mellonella*, зараженных сублетальной (ЛК15) и полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ) (* $p \leq 0.05$ по сравнению с незараженными насекомыми (контроль), $n=60$ на вариант на каждую временную точку).

Таким образом, уменьшение общего числа гемоцитов отмечено при заражении личинок *G. mellonella* как сублетальной, так и полулетальной концентрацией бактерий БТ. Полученные результаты согласуются с данными, отмеченными другими исследователями, в которых показано уменьшение количества гемоцитов у непарного шелкопряда *L. dispar* и капустной совки *Trichoplusia ni* при развитии бактериоза БТ (Ericsson, Janmaat, 2009; Broderick et

al., 2010). Кроме того, отмечено достоверное снижение общего количества гемоцитов у совки ипсилон *Agrotis ipsilon* и долгоносика *Rhynchophorus ferrugineus* при скармливании как сублетальной, так и полулетальной концентраций бактерий БТ (El-Aziz, 2010; Manachini et al., 2011). Снижение общего количества гемоцитов зарегистрировано у различных насекомых при инфицировании другими микроорганизмами, однако причины остаются не известными (Ericsson et al., 2009). Возможно, снижение общего числа гемоцитов связано с участием гемоцитов в репарационных процессах после повреждения эпителиальных клеток кишечника токсином БТ. Участие гемоцитов в репарационных процессах различных тканей было отмечено у многих видов насекомых, в том числе и для вошинной огневки, где была показана их роль в заживлении поврежденной кутикулы у личинок (Rowley, Ratcliffe, 1978). На снижение количества гемоцитов также могут оказать влияние снижение питания насекомых, следствием чего может быть голодание и снижение процесса гемопоэза (Siva-Jothy, Thompson, 2002; Lee et al., 2006; Brown et al., 2009).

Фенолоксидазная активность гемоцитов

У нативных личинок вошинной огневки гемоциты с фенолоксидазной активностью (ФО положительные), то есть клетки с включениями в виде меланистических гранул или со сплошной темной окраской, составляли в среднем 9.73% ($\pm 0.43\%$) от общего числа клеток в гемолимфе. При сублетальной инфекции мы не зафиксировали достоверных изменений в соотношений ФО-положительных и ФО-отрицательных гемоцитов. Однако, при заражении БТ в концентрации ЛК50 было установлено достоверное снижение числа ФО-положительных гемоцитов (в 1.4 раза) в течении всех трех дней эксперимента ($p = 0.002$), ($p = 0.018$), ($p = 0.001$) соответственно (рисунок 12). Кроме того, было установлено достоверное отличие в проценте ФО-положительных гемоцитов у насекомых при сублетальном и полулетальном заражении на первый ($p = 0.006$), второй ($p = 0.001$) и третий ($p \leq 0.001$) дни инфекции (рисунок 12).

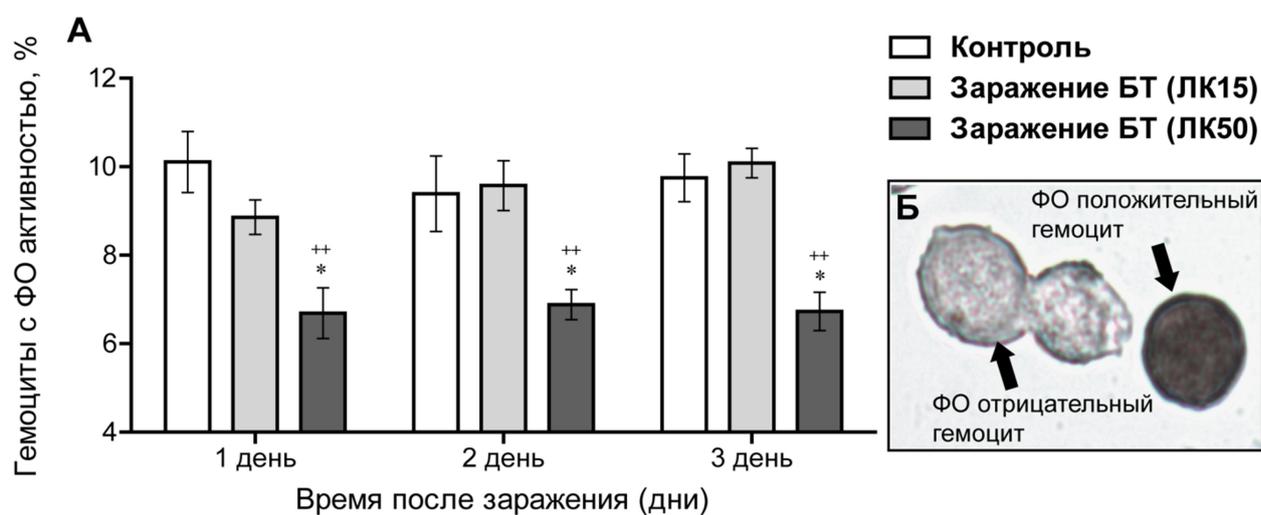


Рисунок 12. Гемоциты с фенолоксидазной (ФО) активностью у личинок *G. mellonella*, зараженных сублетальной (ЛК15) и полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ) (А) (* $p \leq 0.05$ по сравнению с незараженными насекомыми (контроль), $n=60$ на вариант на каждую временную точку) (Б) гемоциты с ФО активностью.

Снижение количества гемоцитов с ФО при заражении насекомых полулетальной дозой бактерий БТ может быть связано с общим уменьшением количества клеток вследствие угнетения гемопоэза или участием гемоцитов в клеточных реакциях иммунитета. В частности, гемоциты с фенолоксидазной активностью, в первую очередь, будут взаимодействовать с поврежденными тканями, адгезировать на своей поверхности бактерии, соответственно скапливаться в местах повреждения кишечника, в результате чего пул данных клеток может истощаться (Marmaras et al., 1996; Tang, 2009).

Фагоцитирующая активность гемоцитов

Фагоцитировать чужеродные агенты способны плазматоциты и гранулоциты. В данной работе мы не разделяли гемоциты по типам, а оценили уровень фагоцитоза бактериальных клеток *E.coli*. Нативные насекомые в среднем имели

26.63 ± 0.86 % гемоцитов участвующих в фагоцитозе. Однако при заражении сублетальными дозами БТ (ЛК15) было отмечено достоверное увеличение процента фагоцитирующих гемоцитов на вторые (p = 0.045) и третьи сутки (p ≤ 0.001) после заражения (рисунок 13). Хотя при полулетальном бактериозе (ЛК50) было отмечено двух кратное снижение фагоцитирующей активности гемоцитов на третий день инфекции (p = 0.044) (рисунок 13).

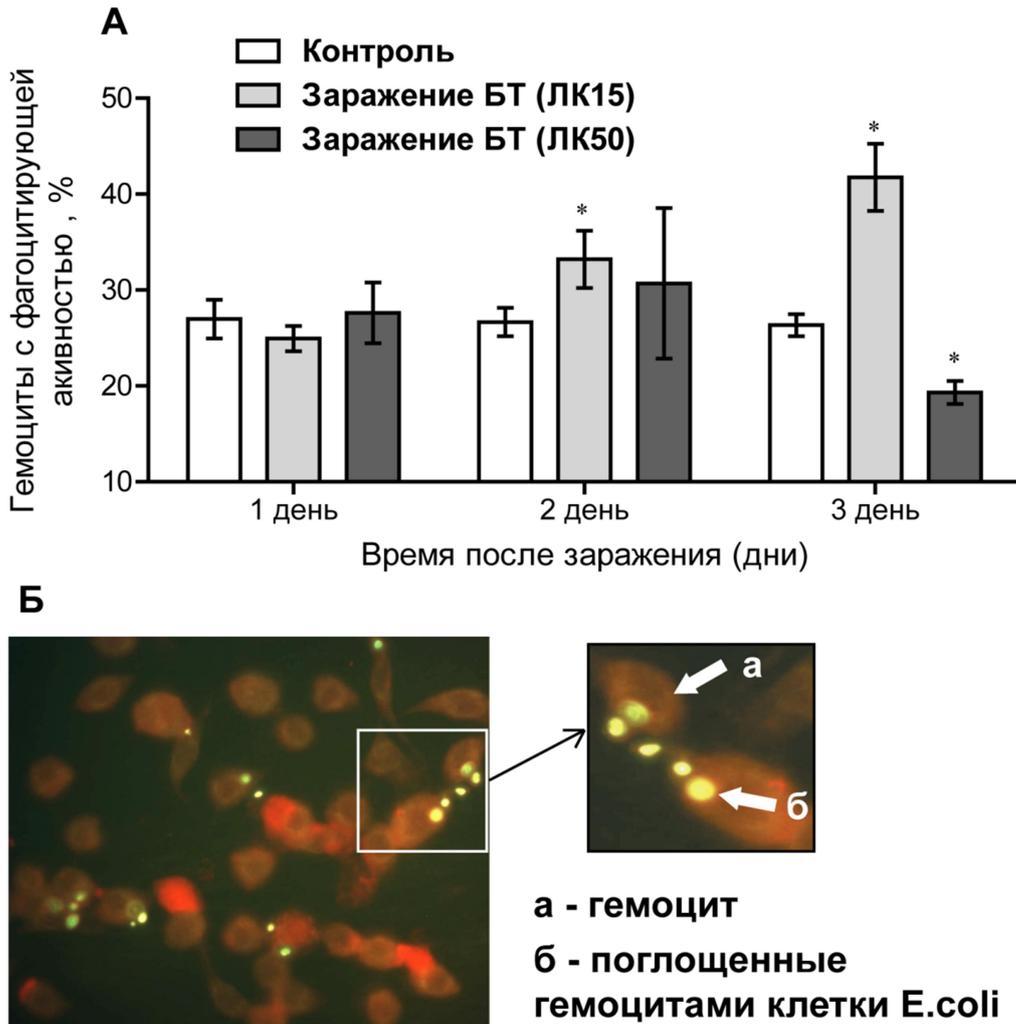


Рисунок 13. Фагоцитарная активность гемоцитов у личинок *G. mellonella*, зараженных сублетальной (ЛК15) и полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ) (А) (* p ≤ 0.05 по сравнению с незараженными насекомыми (контроль), n=60 на вариант на каждую временную точку) (Б) гемоциты с фагоцитарной активностью; гемоцит (а), фагоцитированные ФИТЦ-меченые клетки *E.coli* (б).

Активность инкапсуляции

Установлено, что при сублетальном бактериозе происходит увеличение активности инкапсуляции нейлоновых имплантантов по сравнению с контролем на вторые ($p = 0.034$) и третьи сутки ($p = 0.007$) после заражения (рисунок 14). Однако, полулетальная инфекция приводила к резкому снижению активности инкапсуляции в гемолимфе зараженных насекомых на вторые ($p = 0.004$) и третьи ($p = 0.007$) сутки (рисунок 14).

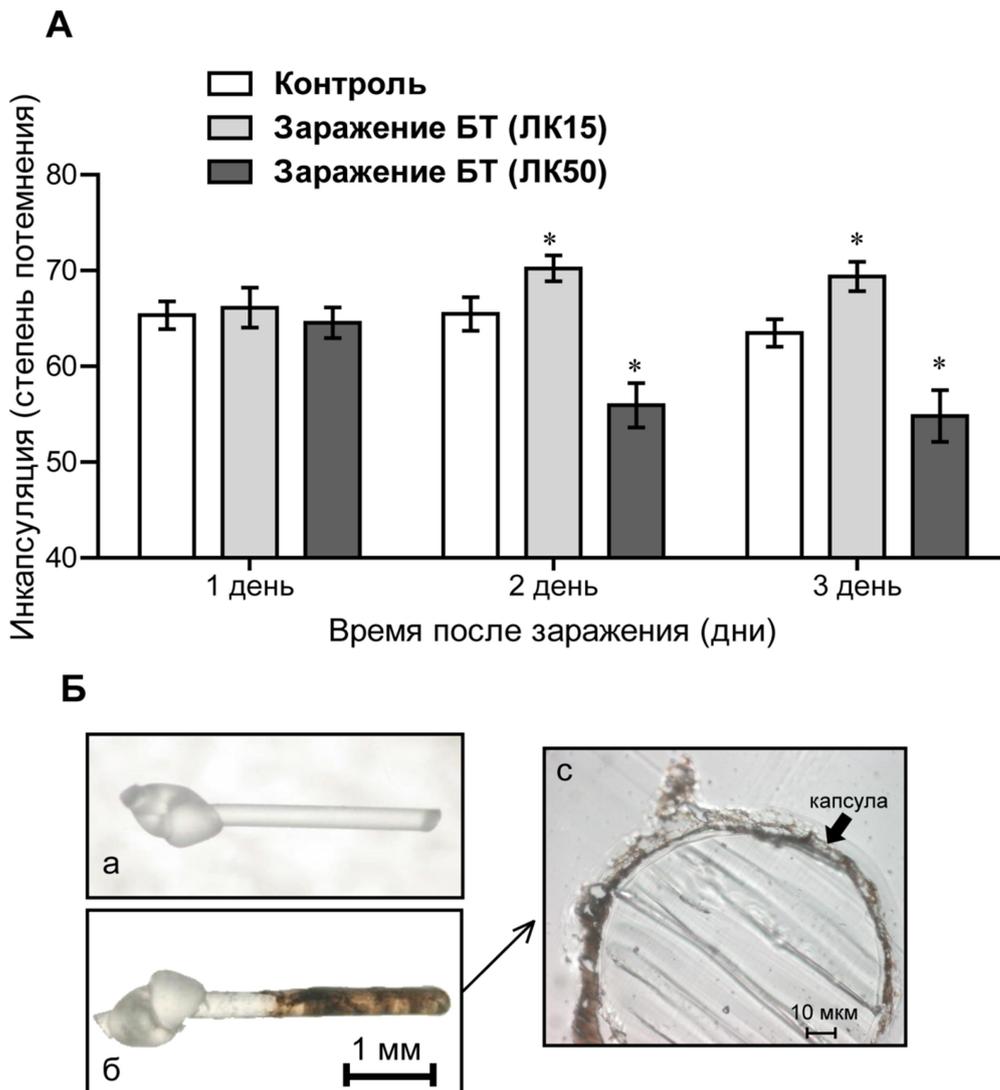


Рисунок 14. Активность инкапсуляции в гемолимфе личинок *G. mellonella*, зараженных сублетальной (ЛК15) и полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ) (А) (* $p \leq 0.05$ по сравнению с незараженными насекомыми (контроль), $n=120$ на вариант на каждую временную точку), (Б)

инкапсуляция нейлоновой нити в гемолимфе насекомых; нативный имплантат (а), имплантат с меланотической капсулой через 24 часа после начала инкапсуляции (б), поперечный срез через нейлоновый имплантат (с).

Таким образом, было показано, что при заражении насекомых сублетальной концентрацией БТ происходит увеличение активности реакций клеточного иммунного ответа - фагоцитоза и инкапсуляции. Полученные данные согласуются с результатами, полученными другими исследователями, в которых показано, что у мельничной огневки *Ephestia kuehniella* происходит повышение активности клеточного иммунного ответа при заражении другим подвидом БТ - *ssp kurstaki* (Rahman et al., 2004). Однако, авторы данного исследования использовали только высокие дозы бактерий и стимулирующих эффектов, наблюдаемых нами при сублетальной инфекции, они не зафиксировали.

ФО активность в плазме гемолимфы

Гемолимфа насекомых является основным местом дислокации проФО и ФО, причем концентрация фермента в плазме значительно выше, чем в гемоцитах. При различных патогенезах соотношение активности в гемоцитах и плазме может значительно меняться. В связи с чем, кроме ФО положительных клеток, мы фиксировали активность в плазме гемолимфы. При сублетальной бактериальной инфекции установлено 1.2-1.5 кратное повышение ФО активности в плазме гемолимфы личинок воцинной огневки на первый ($p \leq 0.001$), второй ($p \leq 0.001$) и третий ($p \leq 0.001$) дни после заражения (рисунок 15). Полулетальный (ЛК50) бактериоз также приводил к увеличению ФО активности у зараженных насекомых на первый ($p = 0.037$), второй ($p = 0.042$) и третий ($p = 0.023$) дни инфекции по сравнению с контролем (рисунок 15). Следует отметить, что активация ФО в плазме была достоверно выше при сублетальном заражении, чем

при полулетальном на первый ($p = 0.016$) и третий ($p = 0.001$) дни эксперимента (рисунок 15).

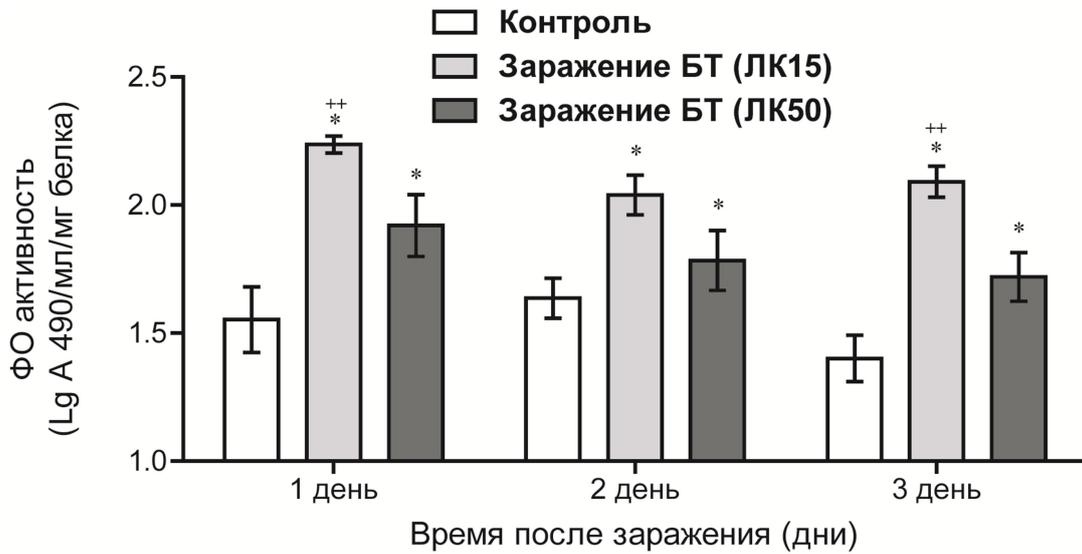


Рисунок 15. Фенолоксидазная активность в гемолимфе у личинок *G. mellonella*, зараженных сублетальной (ЛК15) и полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ) (* $p \leq 0.05$ по сравнению с незараженными насекомыми (контроль), ++ $p < 0.05$ по сравнению с ЛК50, $n=60$ на вариант на каждую временную точку).

Коагуляция гемолимфы

Мы не обнаружили достоверных отличий в коагуляции гемолимфы между контрольными насекомыми и насекомыми, зараженными сублетальной дозой бактерий (рисунок 16). Однако, полулетальная инфекция приводила к снижению активности коагуляции в течении всех трех суток эксперимента ($p = 0.008$), ($p \leq 0.001$), ($p = 0.002$) соответственно (рисунок 16). Следует отметить, что в течении всего эксперимента, у насекомых зараженных ЛК50 активность коагуляции была ниже чем у насекомых зараженных ЛК15 ($p = 0.048$), ($p = 0.007$), ($p = 0.039$) соответственно дням после заражения (рисунок 16).

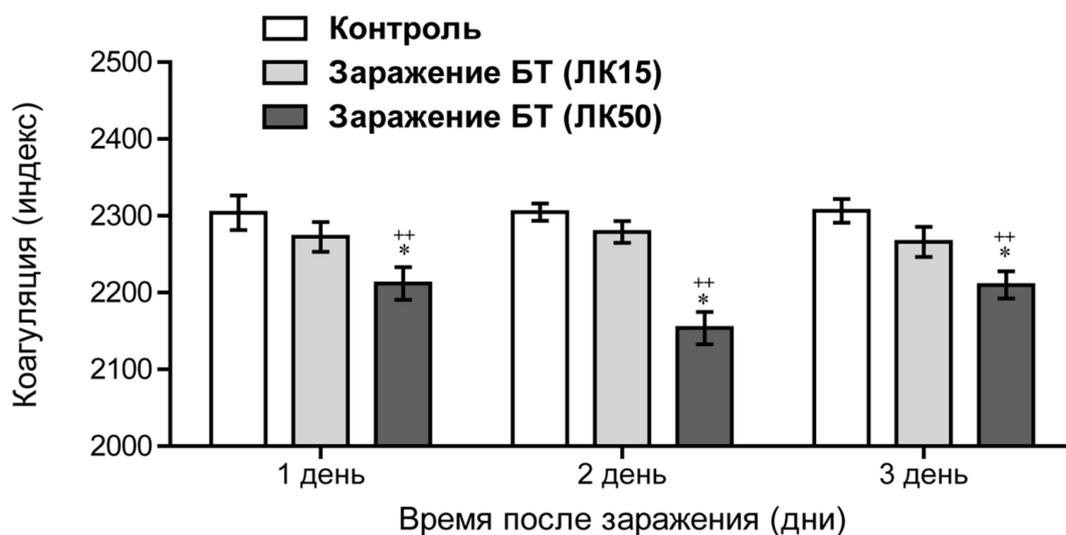


Рисунок 16. Активность коагуляции в гемолимфе у личинок *G. mellonella*, зараженных сублетальной (ЛК15) и полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ) (* $p \leq 0.05$ по сравнению с незараженными насекомыми (контроль), $n=60$ на вариант на каждую временную точку).

Известно, что повреждение кутикулы или кишечника может приводить к локальной активации коагуляции, однако активация усиливается, если повреждение сопровождается проникновением чужеродных агентов, кроме того, может происходить образование коагулированных сгустков вокруг проникших патогенов, что ограничивает распространение микроорганизмов в гемоцеле насекомых (Haine et al., 2007). К сожалению, работ по изучению процесса коагуляции при бактериозе БТ практически не существует. Известно, что некоторые прокоагулянты могут инактивировать токсины БТ (Ma et al., 2005; Ma et al., 2012). Наблюдаемое нами снижение активности коагуляции (рисунок 16), при полулетальной бактериальной инфекции может быть связано с недостатком компонентов коагуляции (липофорин, кальций, трансглутаминаза) (Altincicek et al., 2008; Dushay, 2009; Li et al., 2002), а также вследствие уменьшения общего

количества гемоцитов, отмеченного нами при полулетальной инфекции БТ (рисунок 11).

Лизоцим-подобная активность в плазме гемолимфы

Сублетальный бактериоз приводил к достоверному увеличению лизоцим-подобной активности в гемолимфе по сравнению с контролем на первый ($p = 0.016$), второй ($p \leq 0.001$) и третий ($p = 0.043$) дни после заражения (рисунок 17). Схожие результаты были получены и при полулетальной инфекции БТ. В частности, после заражения ЛК50 активность лизоцима была выше, чем в контроле на первые ($p = 0.002$), вторые ($p \leq 0.001$) и третьи ($p = 0.033$) сутки (рисунок 17).

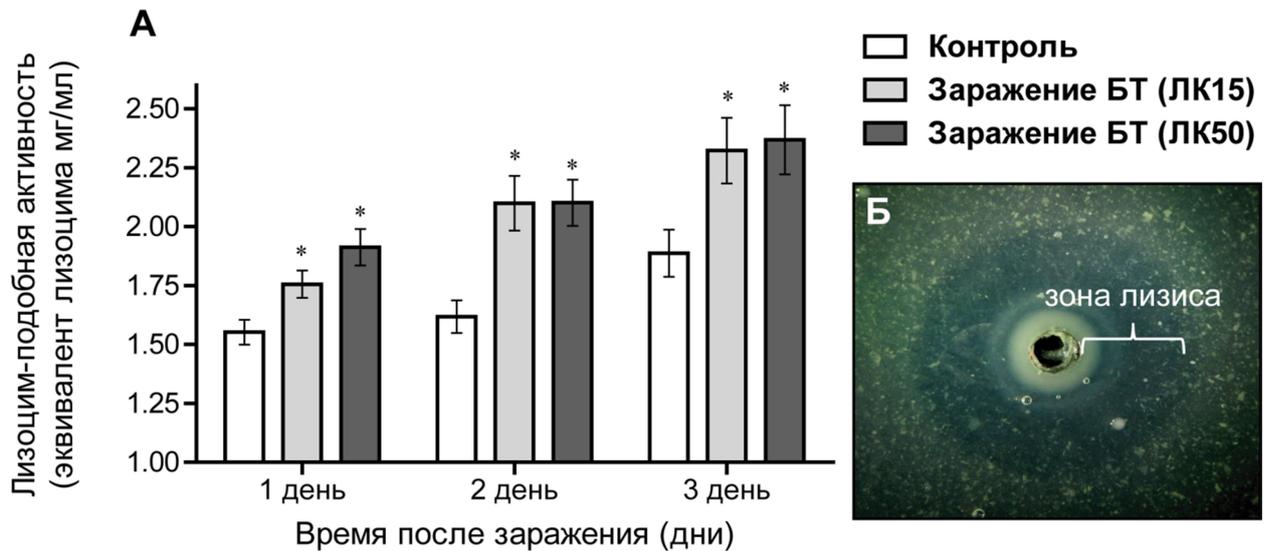


Рисунок 17. Лизоцим-подобная активность в гемолимфе у личинок *G. mellonella*, зараженных сублетальной (ЛК15) и полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ) (А) (* $p \leq 0.05$ по сравнению с незараженными насекомыми (контроль), $n=60$ на вариант на каждую временную точку), литическая активность гемолимфы по отношению к клеточным стенкам *Mirococcus lysodeikticus*) (Б).

Уровень экспрессии генов антимикробных белков в жировом теле и кишечнике

Антимикробные белки (АМБ) являются важнейшим компонентом иммунных реакций насекомых. С помощью метода ПЦР в реальном времени мы оценили уровень экспрессии ряда генов, отвечающих за синтез антимикробных пептидов, в жировом теле и эпителиальной ткани кишечника насекомых на третьи сутки после инфицирования БТ (рисунок 18, рисунок 19). Заражение насекомых двумя концентрациями бактерий приводило к увеличению синтеза практически всех изучаемых АМБ в жировом теле и ткани кишечника инфицированных насекомых по сравнению с контролем (рисунок 18, рисунок 19). При заражении насекомых полулетальной концентрацией бактерий БТ в жировом теле было зарегистрировано достоверное ($p < 0.05$) увеличение уровня экспрессии гловерина по сравнению с насекомыми, зараженными сублетальной дозой БТ. Также была отмечена тенденция к увеличению экспрессии галлеримицина у насекомых, зараженных бактериями БТ ЛК50. При этом уровень экспрессии цекропина Д был достоверно ($p < 0.05$) ниже в жировом теле насекомых, инфицированных полулетальной дозой БТ по сравнению с насекомыми, зараженными сублетальной дозой бактерий (рисунок 18).

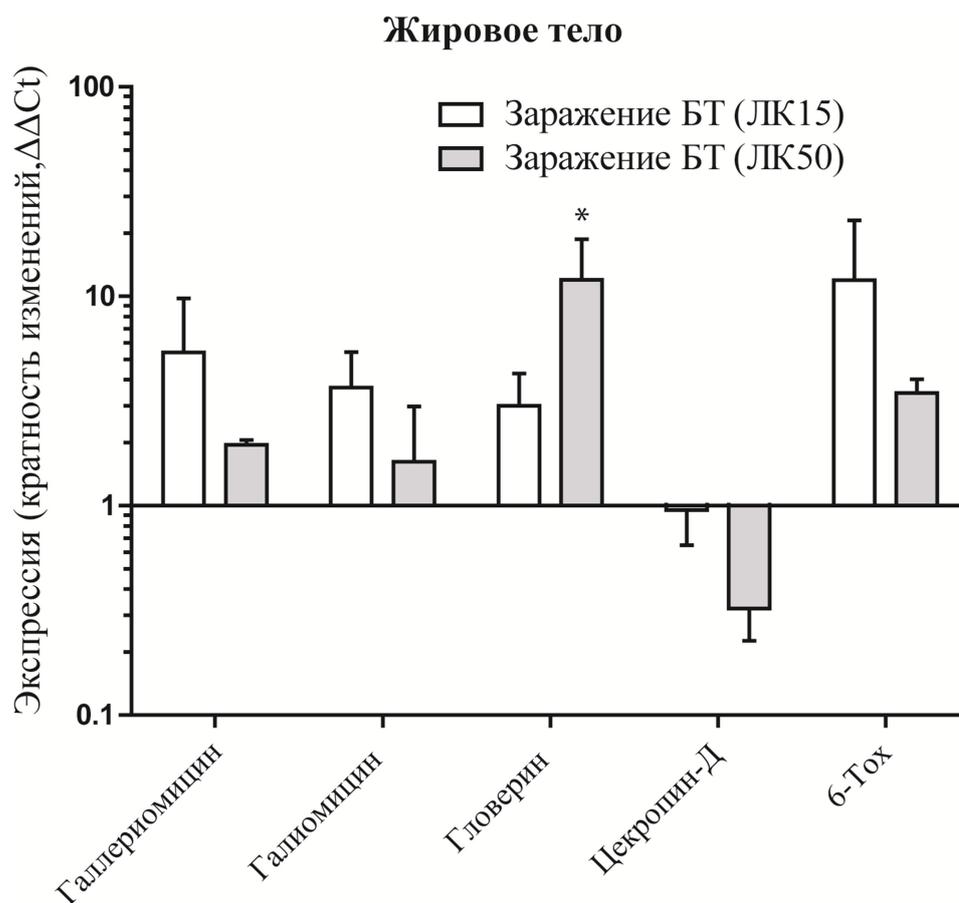


Рисунок 18. Экспрессия антимикробных белков в жировом теле личинок *G. mellonella*, зараженных сублетальной (ЛК15) и полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ) (* $p \leq 0.05$ по сравнению с насекомыми, зараженными бактериями БТ ЛК15, $n=3$ на вариант для каждого гена).

Следует отметить, что синтез АМБ насекомых в ответ на инфекцию в основном изучают в жировом теле. В тоже время «локальный» синтез АМБ в кишечнике, т.е. непосредственно в месте проникновения и развития патогенна, может играть важную роль на первых этапах воздействия бактерий и их метаболитов на организм насекомых. При изучении уровня экспрессии генов,

отвечающих за синтез АМБ в кишечнике, были получены следующие данные (рисунок 19). Заражение насекомых полулетальной дозой бактерий вызывало достоверное ($p < 0.05$) увеличение уровня экспрессии цекропина Д, а также была отмечена тенденция к увеличению уровня экспрессии галлериомицина в кишечнике по сравнению с уровнем синтеза у насекомых, зараженных сублетальной концентрацией бактерий (рисунок 19). Необходимо отметить, что заражение насекомых бактериями вызывало достоверно ($p < 0.05$) более высокий уровень экспрессии таких генов антимикробных пептидов, как галлериомицин и галиомицин, в кишечнике инфицированных насекомых по сравнению с уровнем синтеза в жировом теле (рисунок 18, рисунок 19).

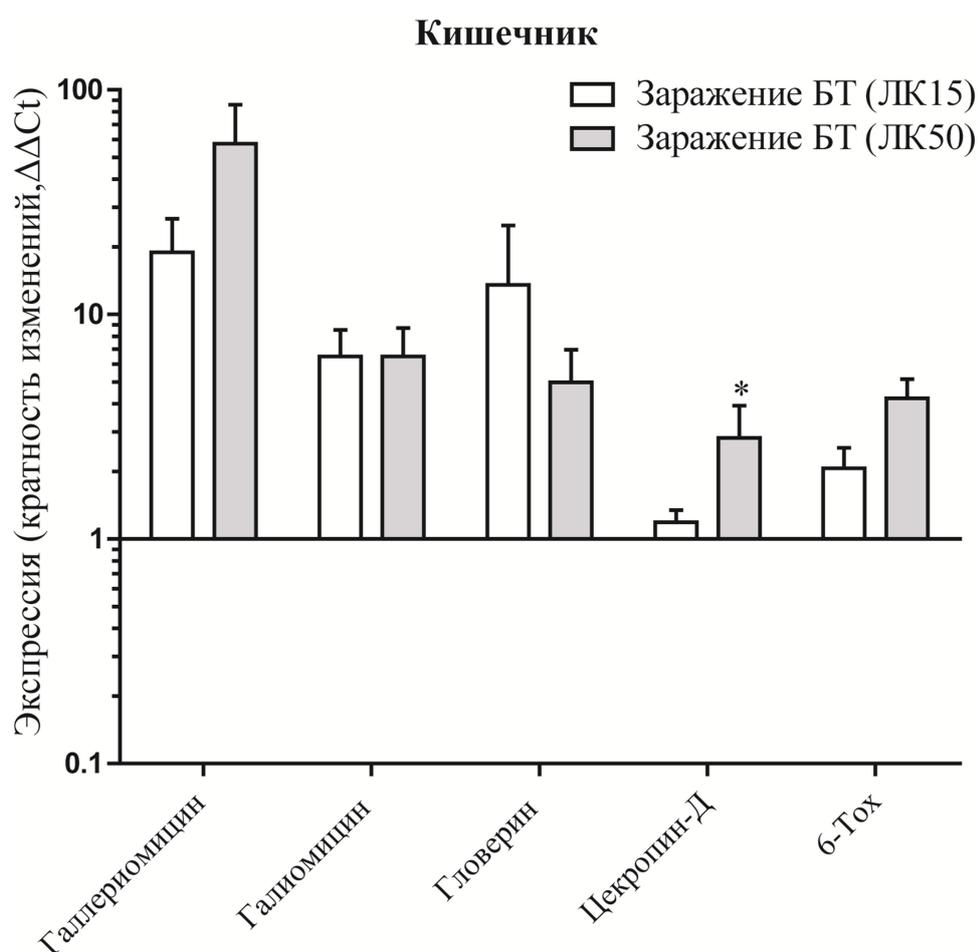


Рисунок 19. Экспрессия антимикробных белков в кишечнике личинок *G. mellonella*, зараженных сублетальной (JK15) и полулетальной (JK50)

концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ) (* $p \leq 0.05$ по сравнению с насекомыми, зараженными бактериями БТ ЛК15, $n=3$ на вариант для каждого гена).

Согласно полученным нами данным, при заражении насекомых бактериями происходит увеличение уровня синтеза таких антимикробных пептидов, как галиомицин, цекропин Д и 6-Тох, которые обладают антибактериальной активностью, в том числе против бактерий *Bt ssp galleriae* и *Bacillus cereus* (Vogel et al., 2011; Xu et al., 2012). Кроме того, при инфицировании насекомых нами был отмечен более высокий уровень экспрессии изучаемых генов в кишечнике насекомых по сравнению с уровнем синтеза в жировом теле.

Сайленсинг гловерина у личинок воцинной 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 БТ (рисунок 20). Известно, что гловерин обладает активностью против БТ (Hwang, Kim, 2011). Полученные нами данные подчеркивают защитную роль данного АМБ при бактериозе.

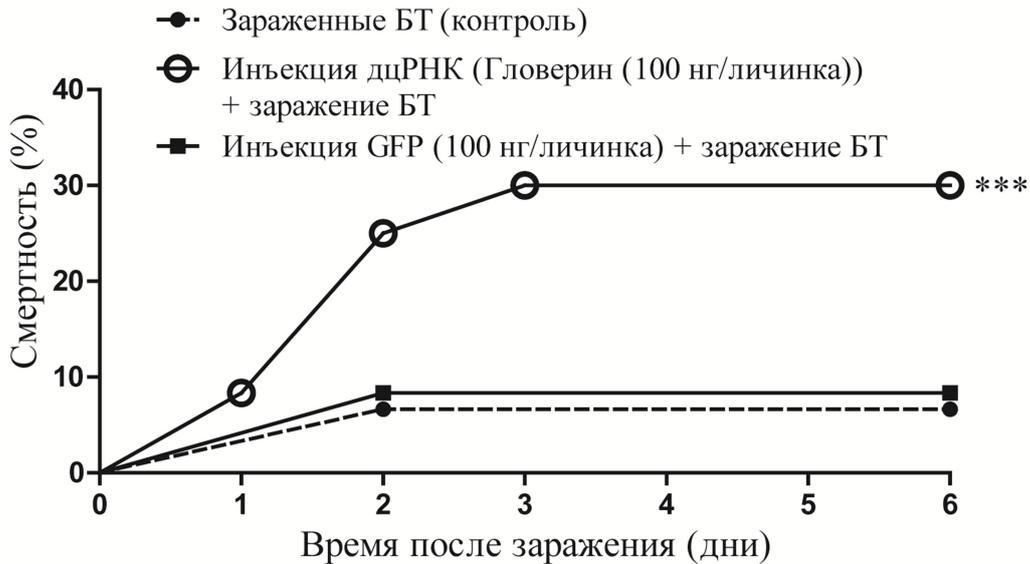


Рисунок 20. Смертность личинок вошинной огневки при заражении *B. thuringiensis* БТ после инъекции физраствора, интерферирующей dsRNA-Гловерин и dsRNA-GFP (как дополнительного) контроля (***) $p < 0.001$ по сравнению с инъекцией физраствора и dsRNA-GFP, $n=150$ на вариант).

Полученные данные согласуются с результатами, полученными другими исследователями, в которых показано, что уровень синтеза АМБ значительно увеличивается в жировом теле у насекомых отряда чешуекрылые в ответ на пероральную бактериальную инфекцию БТ (Hwang, Kim 2011; Yang et al., 2011; Vogel et al., 2011; Xu et al., 2012). Однако, увеличение уровня экспрессии генов, отвечающих за синтез АМБ в кишечнике, при развитии кишечного бактериоза БТ у насекомых отряда чешуекрылые было показано впервые. Таким образом, установлено, что происходит активация неспецифического антимикробного ответа на кишечную бактериальную инфекцию БТ. Показано, что вегетативные клетки БТ чувствительны к ряду АМБ (Yang et al., 2011). По-видимому, АМБ насекомых могут уничтожать вегетативные клетки БТ, образующиеся из попавших в кишечник спор БТ. Это может быть важным этапом антибактериальной защиты, потому что для успешного развития бактериоза БТ

вегетативные клетки должны синтезировать ряд факторов вирулентности (Agaisse et al., 1999). Кроме того, известно, что различные виды бактериальной микрофлоры кишечника также могут принимать участие в процессе септицемии (Broderick et al., 2009; Broderick et al., 2010; Raymond et al., 2010). По-видимому, действие АМБ может быть направлено не только на бактерии БТ, но и на другие бактерии кишечной микрофлоры. Кроме того, АМБ будут являться мощной системой, предотвращающей развитие вторичных инфекций (Wojda et al., 2009; Mak et al., 2010).

Обобщая полученные данные, можно сделать следующие выводы. Иммунный ответ является одним из компонентов индуцированной резистентности насекомых к бактериям БТ и может принимать участие в защите организма насекомого при бактериальной кишечной инфекции. При этом следует отметить активное участие АМБ при бактериозе, и особенно их повышенный синтез в ткани кишечника. Кроме того, увеличение смертности насекомых при подавлении экспрессии АМБ – гловерина, свидетельствует о важной роли данных молекул в защите против бактериальной инфекции БТ.

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

Активность фенолоксидаз и инкапсуляции в гемолимфе

При сравнении активности фенолоксидаз плазмы не было показано достоверных отличий у личинок *G. mellonella* селектированной линии по сравнению с насекомыми контрольной линии (рисунок 21, Б). Было установлено достоверное ($p < 0.05$) снижение активности процесса инкапсуляции у личинок *G. mellonella* селектированной линии по сравнению с насекомыми контрольной линии (рисунок 21, А).

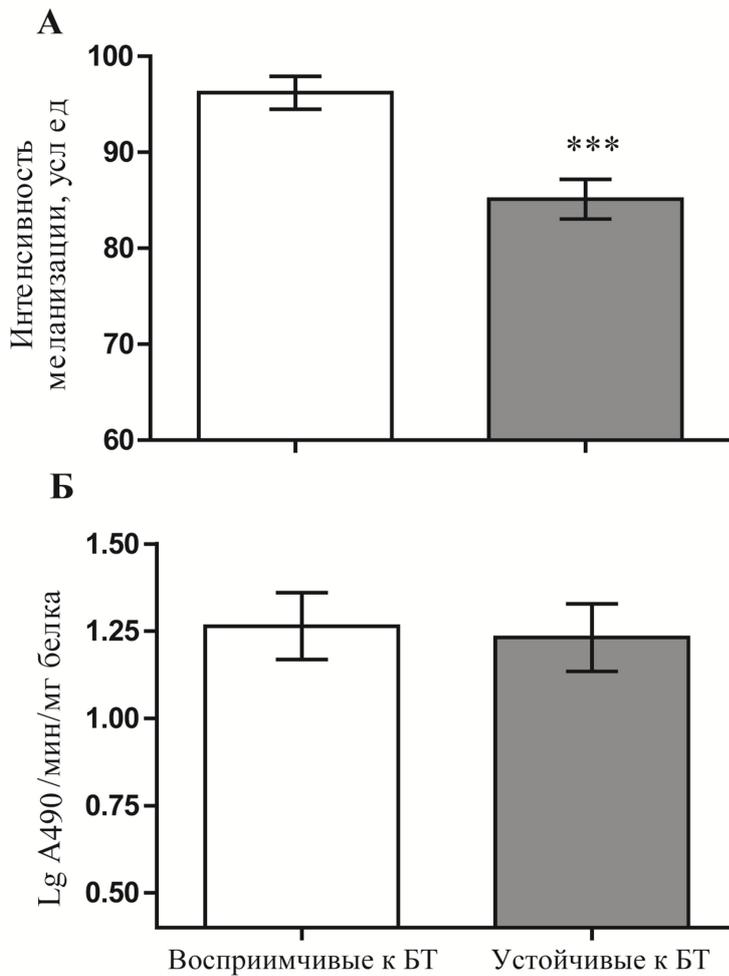


Рисунок 21. Активность инкапсуляции (А) и фенолоксидаз в плазме (Б) личинок селектированной линии (устойчивые к *B. thuringiensis* БТ) и контрольной линии (восприимчивые к БТ) (***) $p \leq 0.001$ по сравнению с контрольной линией, $n=60-120$ на вариант).

Исследования клеточного и гуморального иммунитета у линий насекомых с повышенной устойчивостью к БТ практически отсутствуют. Существуют единичные работы, в которых показано, что ФО система и липофорины могут быть ответственны за увеличение устойчивости *Helicoverpa armigera* к Cry1Ac токсину БТ (Ma et al., 2005; Sarjan et al., 2009). Мы не наблюдаем увеличения

активности ФО и инкапсуляции у устойчивых насекомых по сравнению с восприимчивыми. Более того, зафиксировано снижение активности инкапсуляции у устойчивых насекомых, что может свидетельствовать о компенсаторных механизмах между реакциями клеточного и гуморального иммунитета, а также другими показателями жизнедеятельности насекомых. Отсутствие адаптации в виде повышенного базового уровня реакций инкапсуляции и ФО у устойчивых насекомых может свидетельствовать об вторичной роли данных защитных систем в формировании резистентности воцинной огневки к БТ в ходе микроэволюции. В связи с этим, в дальнейших исследованиях иммунитета у устойчивых насекомых, мы сосредоточили свое внимание на локальных иммунных реакциях в кишечнике как месте проникновения инфекции. Кроме того, был проведен комплекс исследований системного иммунного ответа АМБ в жировом теле.

Лизоцим-подобная активность в кишечнике

Лизоцим-подобная активность в кишечнике как восприимчивой так и устойчивой линий достоверно увеличивалась в 1.5 раз при заражении ($p < 0.05$, $p < 0.01$) (рисунок 22).

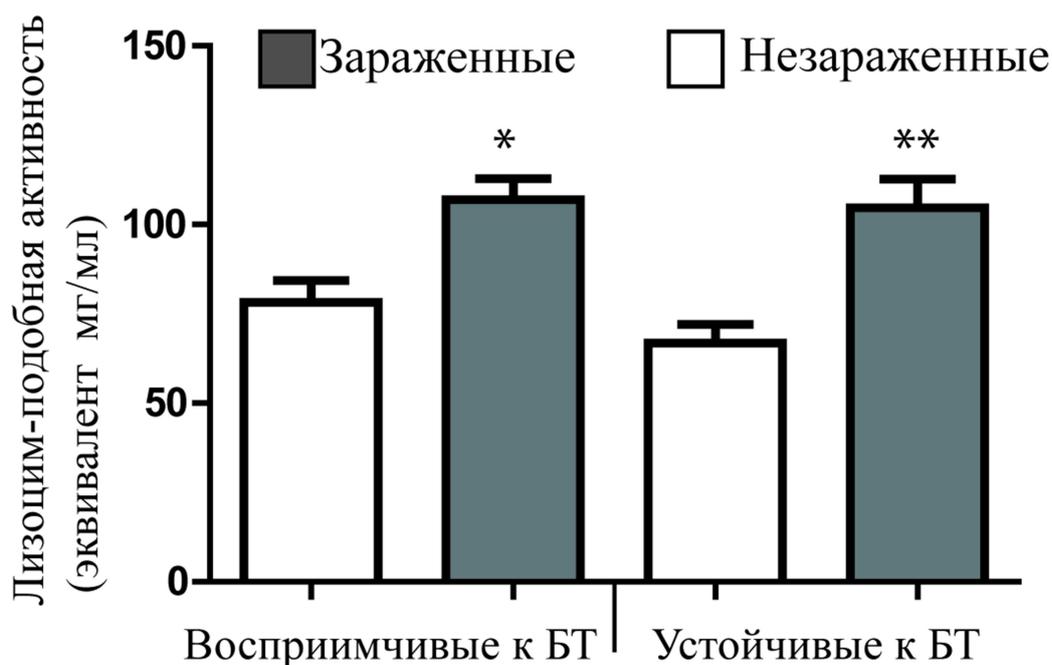


Рисунок 22. Лизоцим-подобная активность в кишечнике личинок селектированной линии (устойчивые к *B. thuringiensis* БТ) и контрольной линии (восприимчивые к БТ) на второй день после заражения ЛК50 БТ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с незараженными насекомыми, $n=100$ на вариант)

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

При анализе иммунного ответа устойчивых и восприимчивых к БТ линий воцинной огневки мы оценили уровень экспрессии различных генов в кишечнике и жировом теле насекомых. Помимо генов отвечающих за синтез АМБ (галлериомицин, галиомицин, гловерин, цекропин-Д и 6-Тох) была проведена оценка двух контигов - 2Gm и контиг 19932 отвечающих за передачу связанных с иммунным ответом сигналов в клетках (сигнальную трансдукцию).

Мы установили, что базовый уровень экспрессии АМБ (без заражения) у устойчивой линии был выше, чем у восприимчивой (в кишечнике в 1.44 ± 0.27 раза) (рисунок 23), в жировом теле в 4.46 ± 1.30 раз) (рисунок 24). При этом, кратность увеличения экспрессии АМБ генов объединенных в общий пул была выше в жировом теле (3.15 ± 0.53) по сравнению с кишечником (1.41 ± 0.23) ($p < 0.05$).

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 (рисунок 24), и в жировом теле (рисунок 23). Следует отметить, что при заражении насекомых обеих линий бактериями БТ, были установлены тканеспецифические различия в уровне экспрессии АМБ. В частности, экспрессия галлериомицина была в 45 раз выше, а галлериомицина, Gloverina и 6-Tox в 6-7 раз выше в кишечнике устойчивой и восприимчивой линий при заражении БТ по сравнению с жировым телом (рисунок 25). В жировом теле зараженных насекомых изменение экспрессии ряда генов было разнонаправленно (галлериомицин снижался у устойчивых, а цекропин-Д и 2GM у восприимчивых). При этом экспрессия АМБ (6-Tox, цекропин-Д, галлериомицин), 2GM, контиг 19932 была в 2-3 раза выше у устойчивых и восприимчивых насекомых при заражении БТ по сравнению с незараженным контролем. Экспрессия контига 19932 была выше (в 40 раз) ($p < 0.05$) в жировом теле устойчивых насекомых при заражении БТ, по сравнению с восприимчивыми (рисунок 25, А).

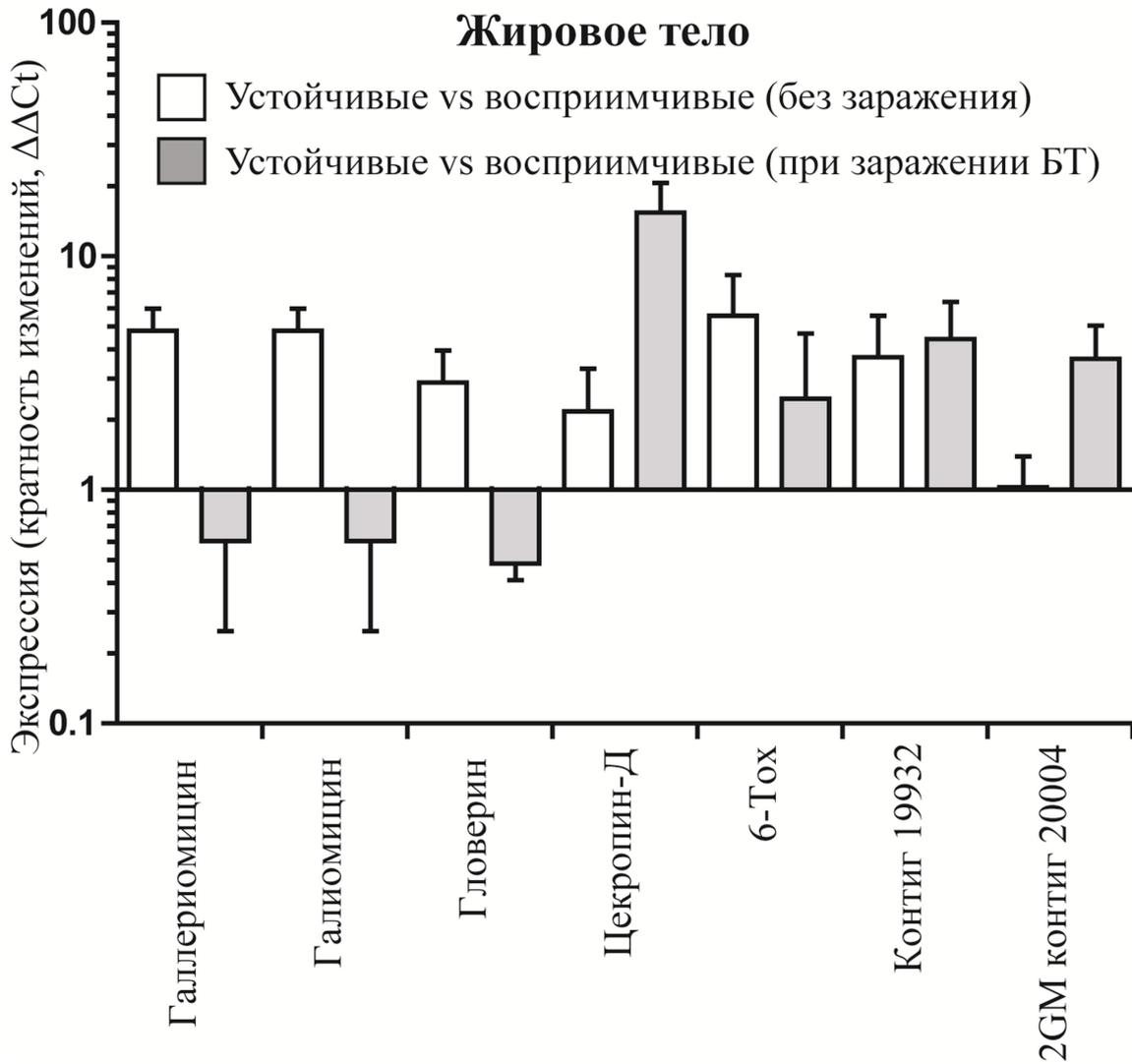


Рисунок 23. Экспрессия антимикробных белков в жировом теле личинок воцинной огневки *G. mellonella* контрольной линии (восприимчивые к *B. thuringiensis* БТ) и селектированной на устойчивость к бактериям линии (устойчивые к БТ), не зараженных и на фоне заражения полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ) (вторые сутки после заражения), данные представлены как кратность изменений в конституциональной (без заражения) экспрессии генов у устойчивых насекомых по сравнению с восприимчивыми и как кратность изменений в экспрессии у устойчивых насекомых по сравнению у восприимчивыми на фоне заражения БТ, $n=3$ на вариант для каждого гена.

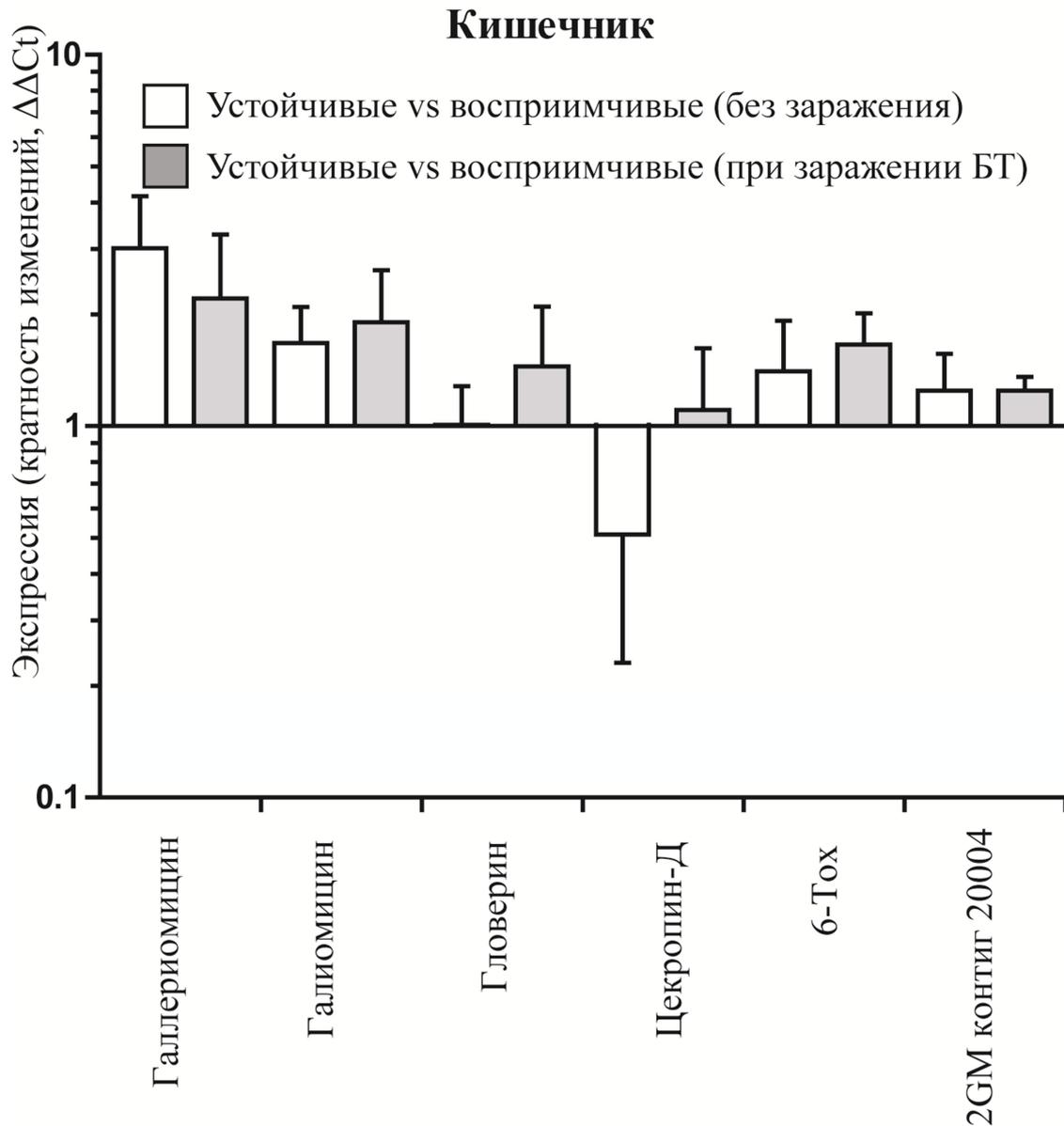


Рисунок 24. Экспрессия антимикробных белков в кишечнике личинок воцинной огневки *G. mellonella* контрольной линии (восприимчивые к *B. thuringiensis* БТ) и селектированной на устойчивость к бактериям линии (устойчивые к БТ), не зараженных и на фоне заражения полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ) (вторые сутки после заражения), данные представлены как кратность изменений в конституциональной (без заражения) экспрессии генов у устойчивых насекомых по сравнению с восприимчивыми и как кратность

изменений в экспрессии у устойчивых насекомых по сравнению у восприимчивыми на фоне заражения БТ, $n=3$ на вариант для каждого гена.

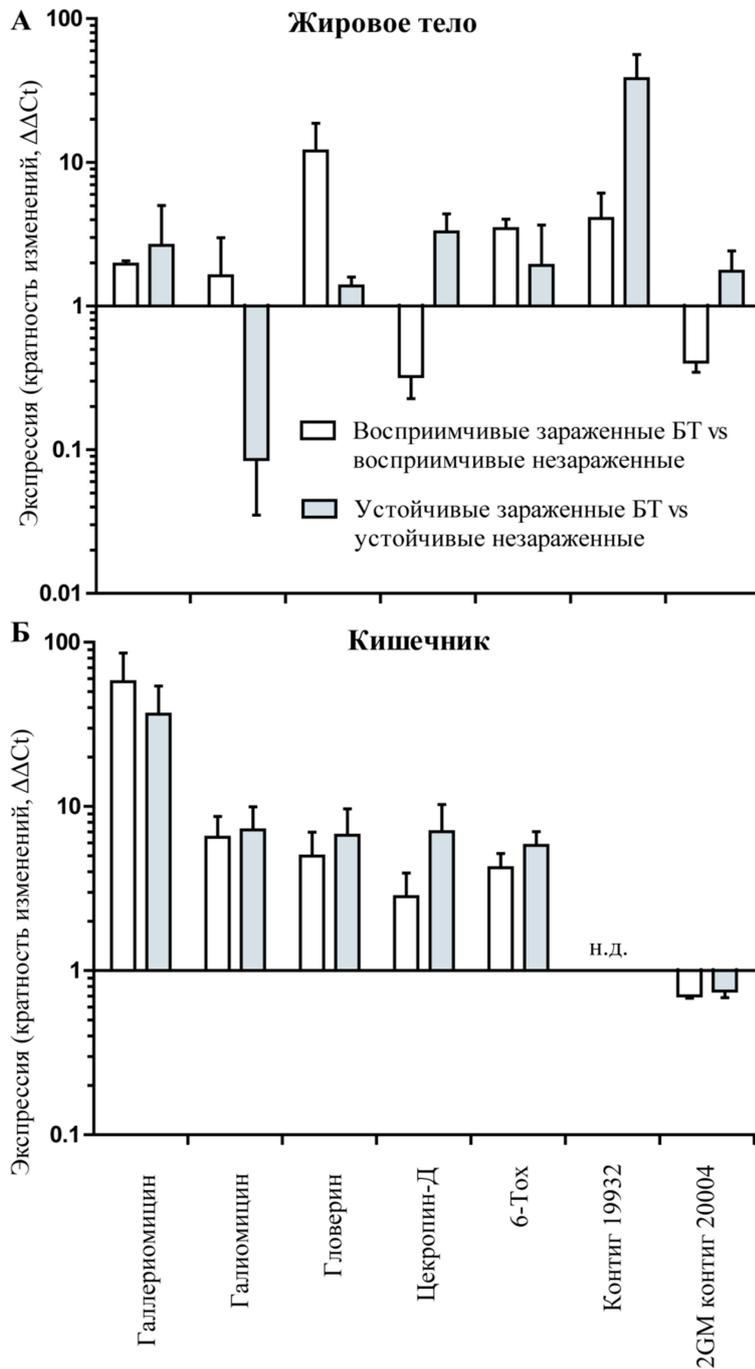


Рисунок 25. Экспрессия антимикробных белков в жировом теле (А) и кишечнике (Б) личинок *G. mellonella* селектированной линии (устойчивые к *B. thuringiensis* БТ) и контрольной линии (восприимчивые к БТ), на вторые сутки после заражения полувлетальной (ЛК50) концентрацией бактерий БТ; данные представлены как кратность изменений в экспрессии генов у зараженных

насекомых по сравнению с конституциональной (без заражения) экспрессией, $n=3$ на вариант для каждого гена.

Нарушение целостности кишечника при бактериозе БТ создает "ворота" для инфекции. На данной стадии бактерии проникают из кишечника в гемоцель, что приводит к септицемии и гибели хозяина. Иммунная система на данном этапе инфекционного процесса может выступать важным фактором, ограничивающим численности проникающих бактерий. Гены кодирующие АМБ имели повышенный базовый уровень экспрессии в кишечнике и жировом теле у устойчивых насекомых. Более того, АМБ и лизоцим активировались при развитии инфекции. Известно, что лизоцим может принимать участие в инактивации бактерий (Eleftherianos, Revenis, 2011). Также было показано, что некоторые рекомбинантные АМБ обладают бактериостатическим воздействием на БТ *in vitro* (Yang et al., 2011). При заражении уровень экспрессии АМБ генов был выше у устойчивых насекомых по сравнению с восприимчивыми. Схожие данные были получены при заражении капустной совки *Trichoplusia ni* низкой дозой *Bt* ssp. *kurstaki* (Ericsson et al., 2009). Таким образом, полученные нами данные и ряд других исследований 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 при бактериозе.

Обобщая полученные результаты, хотелось бы отметить, что пероральное заражение насекомых сублетальными дозами БТ приводит к увеличению клеточного иммунного ответа - фагоцитоза и инкапсуляции. Наши данные согласуются с исследованиями на *Ephestia kuehniella*. Устойчивость личинок *E. kuehniella* к БТ была повышена на фоне презаражения низкими дозами бактерий и коррелировала с повышенной меланизацией в гемолимфе (Rahman et al., 2004).

Возможно, что сублетальный бактериоз БТ приводит к незначительным повреждениям клеток эпителия кишечника, которых не достаточно для его разрушения. Однако повреждения эпителиальных клеток и антигены проникающие в гемоцель (споры бактерий, металлопротеазы и фрагменты пептидогликана) запускают сигнальную трансдукцию, приводящую к насыщению гемолимфы активаторами иммунитета и соответственно к "подготовке" организма противостоять бактериальной инфекции (Altincicek et al., 2007; Broderick et al., 2009). Существует предположение о том, как происходит передача сигнала в гемоцель для активации иммунного ответа, при проникновении бактерий в кишечник насекомых. Вероятно, сигнал поступает в гемоцель при связывании токсина с рецептором на поверхности эпителиальной клетки с последующей активацией процессов сигнальной трансдукции, что в ряде случаев может и не приводить к разрушению клетки (Jurat-Fuentes et al., 2006; Zhang et al., 2006). Кроме того, при разрушении клеток кишечника бактериальным токсином, компоненты клеток и бактерий могут проникать в гемоцель насекомых (Griffitts, Aroian, 2005; Rahman et al., 2007; Broderick et al., 2010). Также вероятно, может происходить синтез сигнальных веществ клетками кишечника (Buchon et al., 2009; Broderick et al., 2009). Существует предположение о том, что такой сигнальной молекулой может являться оксид азота, который проникает в гемоцель из кишечника и запускает сигнальный каскад активации синтеза антимикробных пептидов в жировом теле (Buchon et al., 2009; Broderick et al., 2009). Следует отметить, что небольшие повреждения эпителия могут восстанавливаться за счет повышения пролиферации (stem cell proliferation) (Baton, Ranford-Cartwright, 2007; Buchon et al., 2010; Castagnola et al., 2011).

Кроме того, о роли иммунных реакций в защите насекомых от кишечной бактериальной инфекции, вызванной БТ, говорят результаты недавних исследований о влиянии иммуносупрессоров, увеличивающих чувствительность насекомых к бактериям. Было показано, что подавление реакций иммунного ответа ингибиторами эйкозаноидов и компонентами яда паразитоидов может

увеличивать чувствительность насекомых к бактериям БТ (Kwon, Kim, 2007; Richards, Dani, 2010; Shrestha, 2010; Broderick et al., 2010).

В заключении хотелось бы отметить, что кишечный бактериоз БТ, особенно сублетальный, приводит к стимуляции клеточной и гуморальной иммунной системы воцинной огневки. При сублетальной инфекции происходит повышение активности всех звеньев иммунного ответа. Воздействие на иммунитет дозозависимое. В частности, острый бактериоз приводит к снижению клеточного иммунного ответа на поздних стадиях инфекции, что вероятно связано с истощением пула гемоцитов на фоне интоксикации. При этом гуморальные иммунные реакция (ФО, лизоцим, АМБ) остаются повышенными, что свидетельствует о своеобразном компромиссе между звеньями клеточного и гуморального иммунитета. Подавление экспрессии гена АМБ –галимицина с помощью РНК интерференции повышает смертность при бактериозе БТ, что подчеркивает важную роль АМБ при кишечном бактериозе. Иммунный ответ устойчивых к БТ насекомых ориентирован на АМБ и в большей степени связан с кишечником. Адаптацией устойчивых насекомых является повышенный базовый уровень иммунитета. Насекомые "подготовлены" к потенциальной инфекции. На основе полученных данных мы можем предположить, что клеточный и гуморальный иммунитет играют важную роль в индуцированных защитных реакциях, а также формировании конституциональной устойчивости к БТ.

3.6. Окислительно-восстановительный баланс у насекомых при бактериозе

B. thuringiensis

3.6.1. Роль антиоксидантной системы в кишечнике при бактериозе

B. thuringiensis

Изучение антиоксидантной (АО) системы насекомых мы проводили на начальных этапах полулетальной инфекции БТ, в так называемый острый период

патогенеза. Острый период бактериоза БТ является крайне интересным для изучения окислительно-восстановительного (ОВ) баланса в кишечнике, так как на ряде позвоночных животных была показана взаимосвязь между окислительным стрессом и острыми стадиями бактериальных кишечных болезней (Mehta et al., 1998; Pavlick et al., 2002). Следует отметить, что термин окислительный стресс широко применяется для описания дисбаланса в системе «оксиданты-антиоксиданты» при свободнорадикальных патологиях у позвоночных (Lih-Brody et al., 1996; Pavlick et al., 2002 и т.д.) и у насекомых (Pardini et al., 1988; Aucoin et al., 1991; Vi, Felton, 1995; Wang et al., 2001). Снижение смертности на второй и третий день после заражения может быть связано как со снижением концентрации токсина в кишечнике, за счет отказа от питания, так и с защитными процессами протекающими в организме зараженных насекомых.

Известно, что действие токсинов БТ на эпителиальные клетки кишечника приводит к нарушению целостности и функциональной активности клеточных мембран. При этом происходит генерация большого количества активированных кислородных метаболитов (АКМ), а также усиление активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), продукты которого также могут являться АКМ (Voctor, Salama, 1983; Штерншис, 1995; Damgaard, 2000). Необходимо отметить, что генерация АКМ происходит в кишечнике у многих животных при развитии воспалительных болезней (Kruidenier, Verspaget, 1997). Эти метаболиты обладают высокой реакционной способностью, они способны уничтожать проникшие бактерии, но в тоже время могут повреждать ткани и органы хозяев (Nappi et al., 2000; Bogdan et al., 2000). В конечном счете, эти процессы могут приводить к разрушению клеток эпителия и дисфункции кишечника. Изучение роли антиоксидантной системы насекомых среди защитных реакций против БТ мы проводили только при остром кишечном бактериозе. В большей степени внимание было сконцентрировано на антиоксидантной системе кишечника, как органа где происходят наиболее важные этапы развития БТ инфекции. Кроме

того, был проведен анализ антиоксидантной системы у насекомых, селектированных на устойчивость к БТ.

Концентрация МДА

Связывание токсина БТ с рецепторами на поверхности цитоплазматической мембраны эпителиальных клеток приводит к образованию пор и нарушению свойств клеточной мембраны. Это может нарушать процессы перекисного окисления липидов и как следствие образования большого количества АКМ. МДА является одним из индикаторов активности ПОЛ (Зенков и др., 2001). На первый день, после заражения насекомых БТ, мы зафиксировали достоверное ($p < 0.05$) увеличение концентрации МДА в кишечнике личинок вошинной огневки по сравнению с незараженными насекомыми (рисунок 26). Однако, на второй день после заражения концентрация МДА в кишечнике насекомых снижалась ($p < 0.001$) (рисунок 26). На третий день концентрация МДА у зараженных насекомых не отличалась от контрольных (незараженных) (рисунок 26).

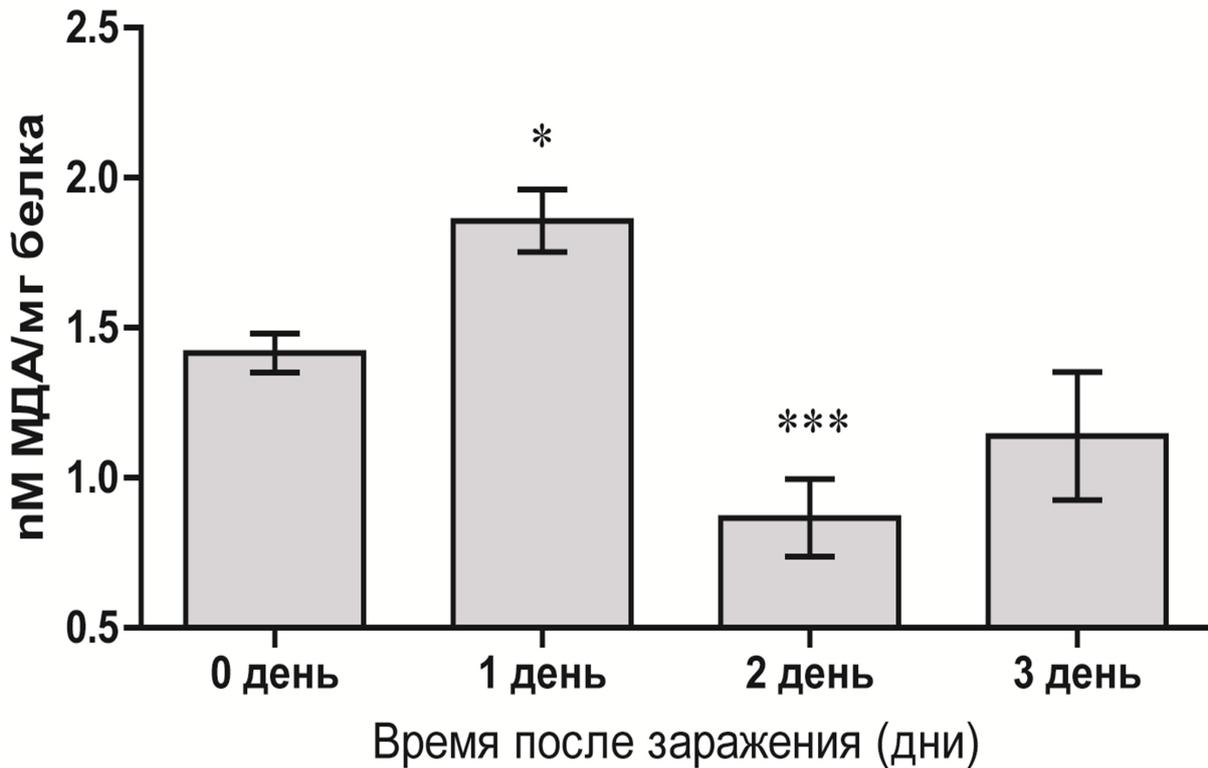


Рисунок 26. Концентрация малонового диальдегида в среднем отделе кишечника личинок вошинной огневки при заражении бактериями БТ (ЛК 50), (* $p < 0.05$ по сравнению с незараженными насекомыми (0 день), *** $p < 0.001$ по сравнению с незараженными насекомыми (0 день) и насекомыми на 1 сутки после заражения, $n = 60$ на вариант).

Полученные результаты свидетельствуют, что высокий уровень МДА и, следовательно, процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), может быть результатом разрушения клеток эпителия кишечника за счет бактериальных эндо и экзо токсинов. Формирование пор в клетках, нарушение целостности плазматической мембраны и окислительного фосфорилирования может приводить к усилению процессов ПОЛ и как следствие к увеличению генерации АКМ.

Соотношение окисленных и восстановленных тиолов

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 увеличение соотношения окисленных тиолов к восстановленным ($p < 0.05$, $p < 0.001$) RSSR/RSH в кишечнике зараженных БТ насекомых по сравнению с незараженными на первый, второй и третий дни эксперимента (рисунок 27).

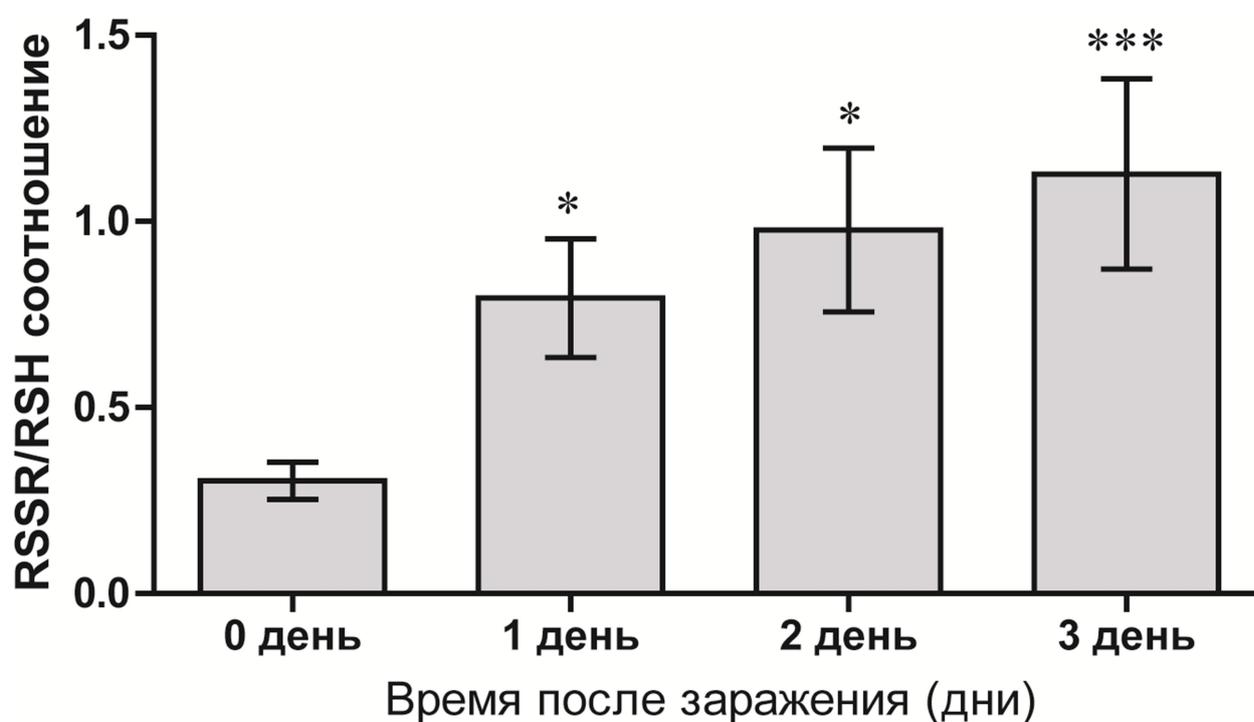


Рисунок 27. Соотношение окисленных тиолов к восстановленным (RSSR/RSH) в среднем отделе кишечника личинок воцинной огневки при заражении бактериями БТ (ЛК 50), (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ по сравнению с незараженными насекомыми (0 день), $n=60$ на вариант).

Изменение баланса тиолов (увеличение отношения RSSR/RSH) при бактериозе может быть свидетельством повышения радикальных окислительных процессов. Повышение отношения окисленных тиолов к восстановленным также является показателем окислительного стресса, в случае нарушения баланса инактивации АКМ другими антиоксидантами (Зенков и др., 2001).

Активность супероксиддисмутазы, глутатион-S-трансферазы и каталазы

При анализе активности ферментативных антиоксидантов в ходе бактериальной инфекции было установлено увеличение активности супероксиддисмутазы (СОД) на первые ($p < 0.001$), вторые ($p = 0.0094$) и третьи ($p = 0.03$) сутки после заражения БТ (рисунок 28). В тоже время, активность каталазы была ниже у зараженных насекомых по сравнению с контролем: на первый день ($p < 0.001$); второй день ($p < 0.001$); третий день ($p < 0.001$) (рисунок 29). Активность глутатион-S-трансферазы (ГСТ) в кишечнике зараженных насекомых была достоверно выше на первый ($p = 0.041$) и третий ($p < 0.001$) дни после заражения по сравнению с контролем (рисунок 30).

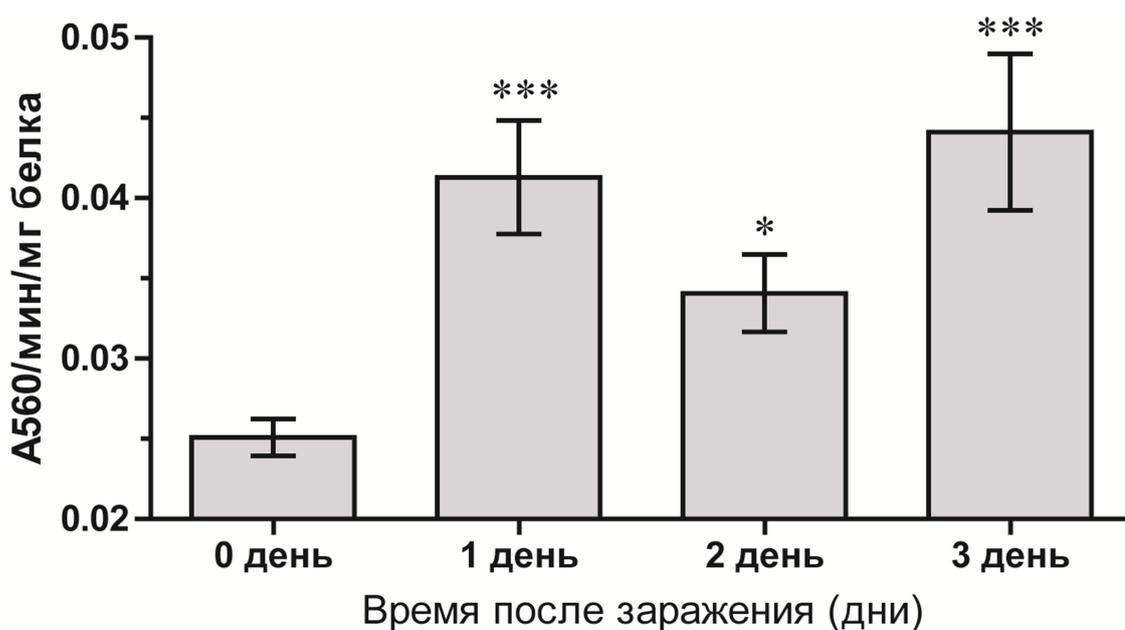


Рисунок 28. Активность супероксиддисмутазы (СОД) в среднем отделе кишечника личинок воцинной огневки при заражении бактериями БТ (ЛК 50), (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ по сравнению с незараженными насекомыми (0 день), $n = 60$ на вариант).

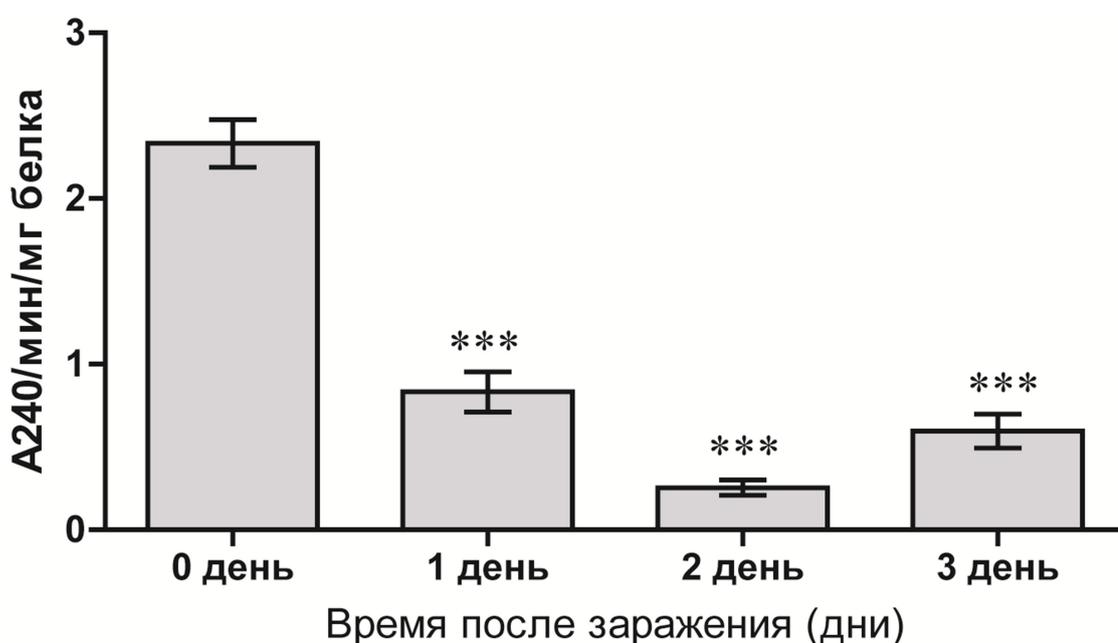


Рисунок 29. Активность каталазы в среднем отделе кишечника личинок воцинной огневки при заражении бактериями БТ (ЛК 50), (*** $p < 0.001$ по сравнению с незараженными насекомыми (0 день), $n = 60$ на вариант).

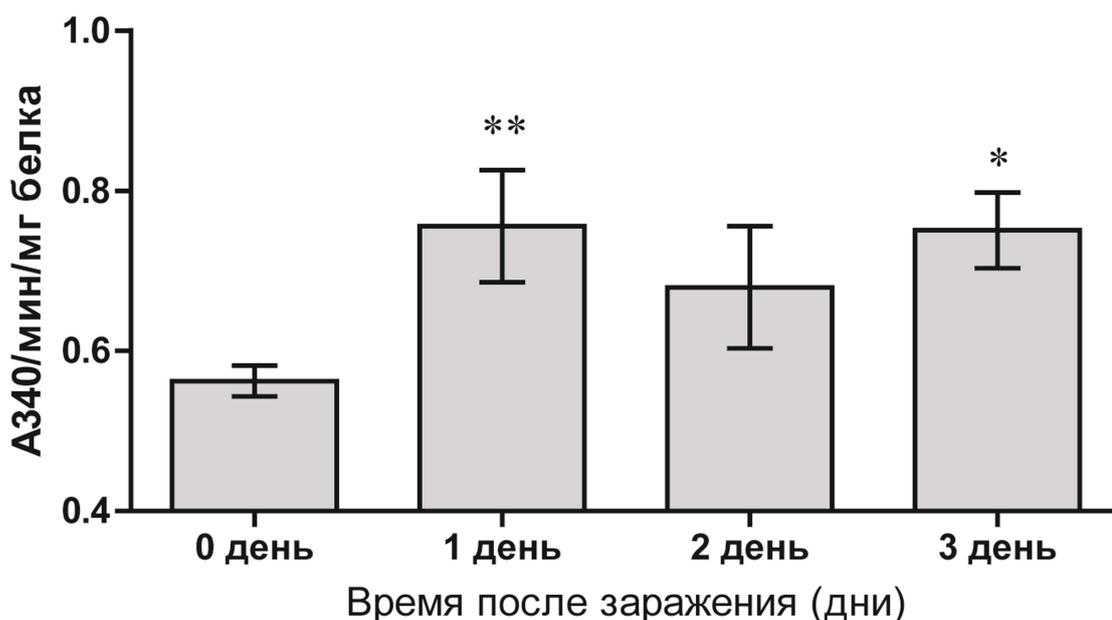


Рисунок 30. Активность глутатион-S-трансферазы (ГСТ) в среднем отделе кишечника личинок воцинной огневки при заражении бактериями БТ (ЛК 50), (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с незараженными насекомыми (0 день), $n=60$ на вариант).

Полученные результаты свидетельствуют, что повышенная активность антиоксидантов СОД и ГСТ может приводить 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 инактивации токсичных продуктов ПОЛ, в частности, ГСТ может инактивировать органические гидропероксиды и защищать клетки от продуктов ПОЛ (Morrissey, Brien, 1980).

Следует отметить, что СОД и каталаза принимают участие в поэтапном восстановлении АКМ (Munday, Winterboume, 1989; Sies, 1991). Повышенная активность СОД при бактериозе может приводить к накоплению перекиси водорода за счет реакции дисмутации супероксиданиона. Как следствие, для инактивации перекиси водорода необходима активация каталазы. Однако,

активность каталазы в кишечнике инфицированных насекомых была понижена в течение всего эксперимента (рисунок 29). Схожие данные были получены в исследованиях на непарном шелкопряде при питании на неблагоприятных растениях (Peric-Mataruga et al., 1996). Авторы отмечали снижение активности каталазы на фоне резкого увеличения активности СОД. Известно, что активность каталазы может подавляться высокими концентрациями супероксиданиона (Kono, Fridovich, 1982; Pardini et al., 1988). Мы предполагаем, что активность каталазы в кишечнике подавлялась за счет высокой концентрации супероксиданиона на фоне нарушений ОВ баланса при бактериозе. Возможно, функции разрушения перекиси в клетках выполняли другие ферменты и/или неферментативные антиоксиданты, такие как тиолы.

На вторые и третьи сутки бактериоза вместе со снижением смертности происходит сначала снижение, а затем нормализация уровня ПОЛ в кишечнике. Вероятно, это связано с активностью антиоксидантов в кишечнике, что приводит к окончанию острой фазы инфекции.

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

Уровень генерации АКМ в кишечнике

У личинок воцинной огневки с повышенной устойчивостью к БТ (селектированных на устойчивость к БТ 20 поколений) и личинок контрольной линии, восприимчивых к БТ был проведен анализ генерации АКМ в кишечнике при заражении бактериями и без заражения. Было установлено, что у личинок устойчивой линии генерация АКМ в кишечнике достоверно ниже ($p < 0.01$) чем у личинок контрольной линии (рисунок 31). Заражение бактериями БТ не приводило к достоверным изменениям уровня генерации АКМ у обеих линий.

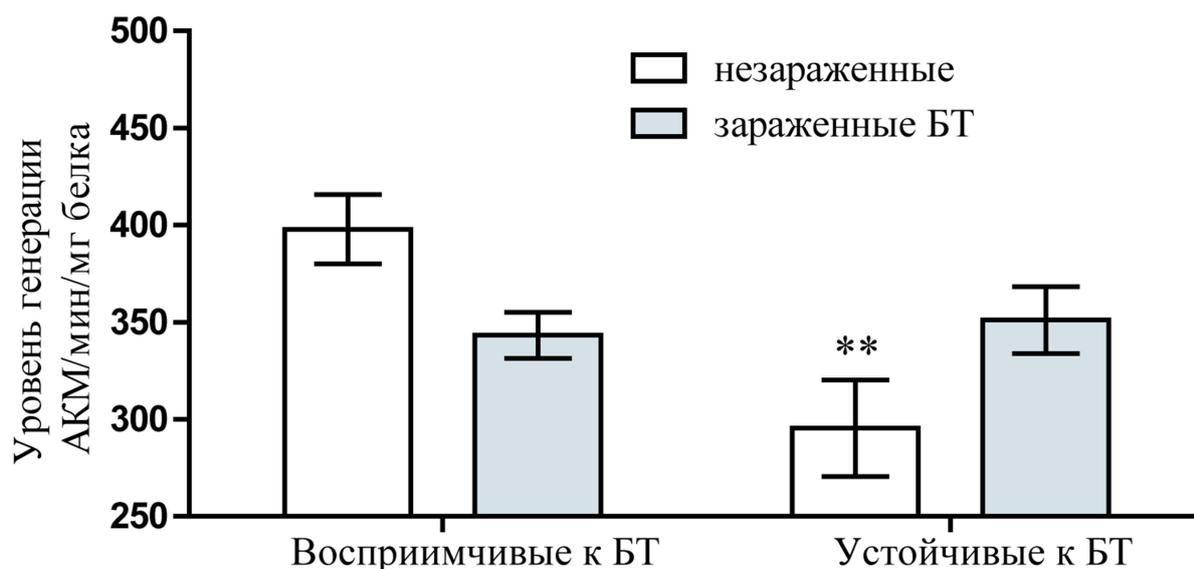


Рисунок 31. Уровень генерации активированных кислородных метаболитов (АКМ) в среднем отделе кишечника личинок вошинной огневки селектированной линии (устойчивые к *B. thuringiensis* БТ) и контрольной линии (восприимчивые к БТ) на первые сутки после заражения БТ (ЛК50), (** $p < 0.01$ по сравнению с восприимчивыми незараженными БТ, $n=90$ на вариант).

Пониженный уровень генерации АКМ у устойчивых насекомых может свидетельствовать о снижении ОВ баланса в кишечнике. Данное снижение, возможно, происходит из-за особенностей метаболизма или повышенной активности антиоксидантов у устойчивых к БТ насекомых.

Концентрация МДА в кишечнике

Концентрация МДА была на одном уровне в кишечниках нативных личинок обеих линий. Однако при заражении происходило достоверное ($p < 0.05$) снижение концентрации МДА у личинок устойчивой линии (рисунок 32).

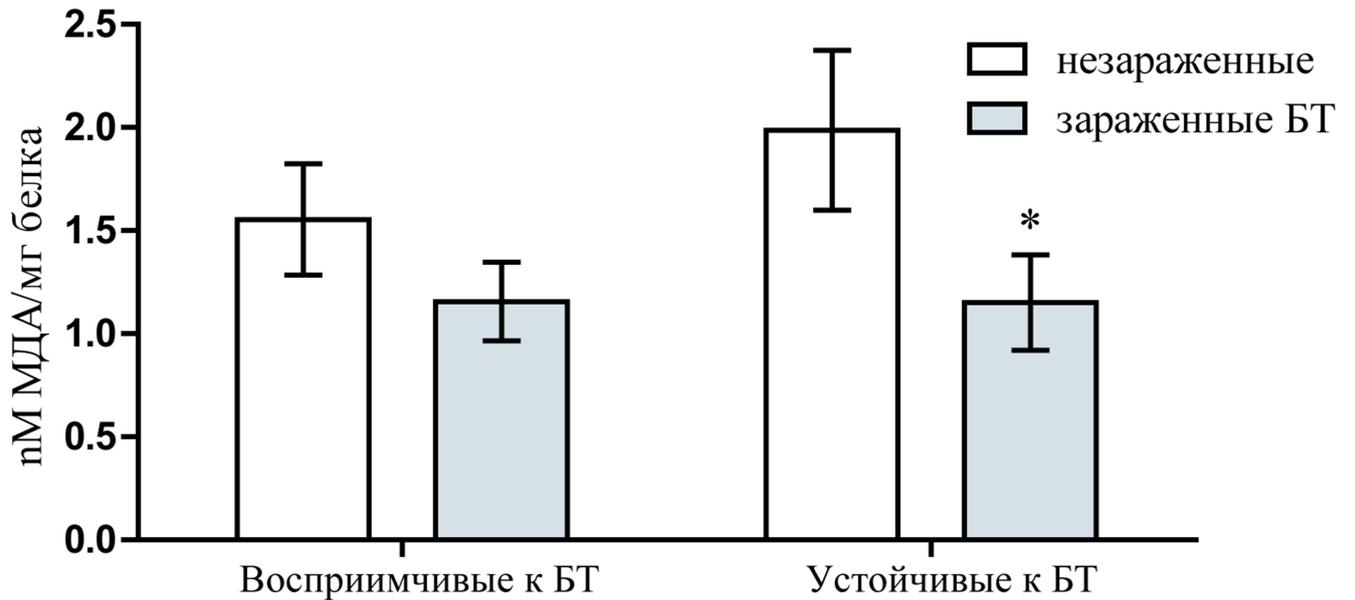


Рисунок 32. Концентрация малонового диальдегида (МДА) в среднем отделе кишечника личинок воцинной огневки селектированной линии (устойчивые к *B. thuringiensis* БТ) и контрольной линии (восприимчивые к БТ) на первые сутки после заражения БТ (ЛК50), (*- $p < 0.05$ по сравнению с насекомыми той же линии незараженными БТ, $n=60$ на вариант).

Соотношение тиолов в кишечнике

Соотношение тиолов восстановленных к окисленным было на одном уровне в кишечниках устойчивой и восприимчивой линий. При заражении зарегистрировано резкое увеличение уровня тиолов у устойчивых насекомых ($p < 0.01$) (рисунок 33).

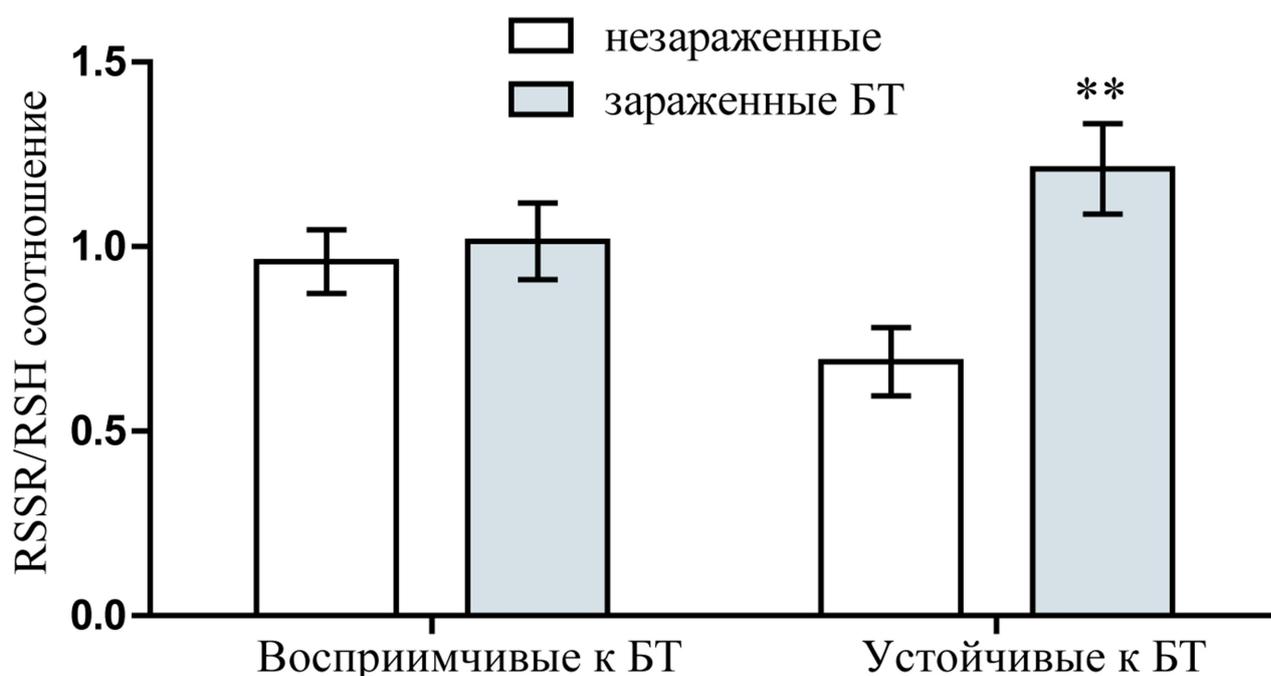


Рисунок 33. Соотношение окисленных тиолов к восстановленным (RSSR/RSH) в среднем отделе кишечника личинок вошинной огневки селектированной линии (устойчивые к *B. thuringiensis* БТ) и контрольной линии (восприимчивые к БТ) на первые сутки после заражения БТ (ЛК50), (** $p < 0.01$ по сравнению с насекомыми той же линии незараженными БТ, $n=60$ на вариант).

Пониженная генерация АКМ в кишечнике устойчивых насекомых, а также снижение концентрации МДА на фоне увеличения восстановления тиолов при заражении БТ может свидетельствовать об адаптации устойчивых насекомых к дополнительному контролю ОВ баланса. Это подчеркивает участие АКМ как одного из патологических факторов бактериоза и вклад антиоксидантной системы в защитные реакции при бактериозах БТ. Для более детального анализа роли АО системы в формировании резистентности к БТ в ходе эволюции, а также при развитии бактериоза, мы изучили уровень экспрессии ряда генов, участвующих в поддержании ОВ баланса, в жировом теле и кишечнике устойчивой и восприимчивой линий при заражении БТ.

Уровень экспрессии регуляторов окислительно-восстановительного баланса в жировом теле и кишечнике

В качестве изучаемых 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. Трансферрин является хелатором, который связывается с железом, что может снижать уровень АКМ из-за снижения реакции Фентона (Зенков и др., 2001). Также следует отметить, что снижение концентрации железа в среде может затруднять развитие энтомопатогенных бактерий рода *Bacillus* (Segond et al., 2014).

По сравнению с восприимчивой линией конституциональный (базовый уровень) экспрессии у насекомых устойчивой линии был выше в жировом теле 3.93 ± 1.07 (рисунок 34) и кишечнике 4.97 ± 2.64 (рисунок 35).

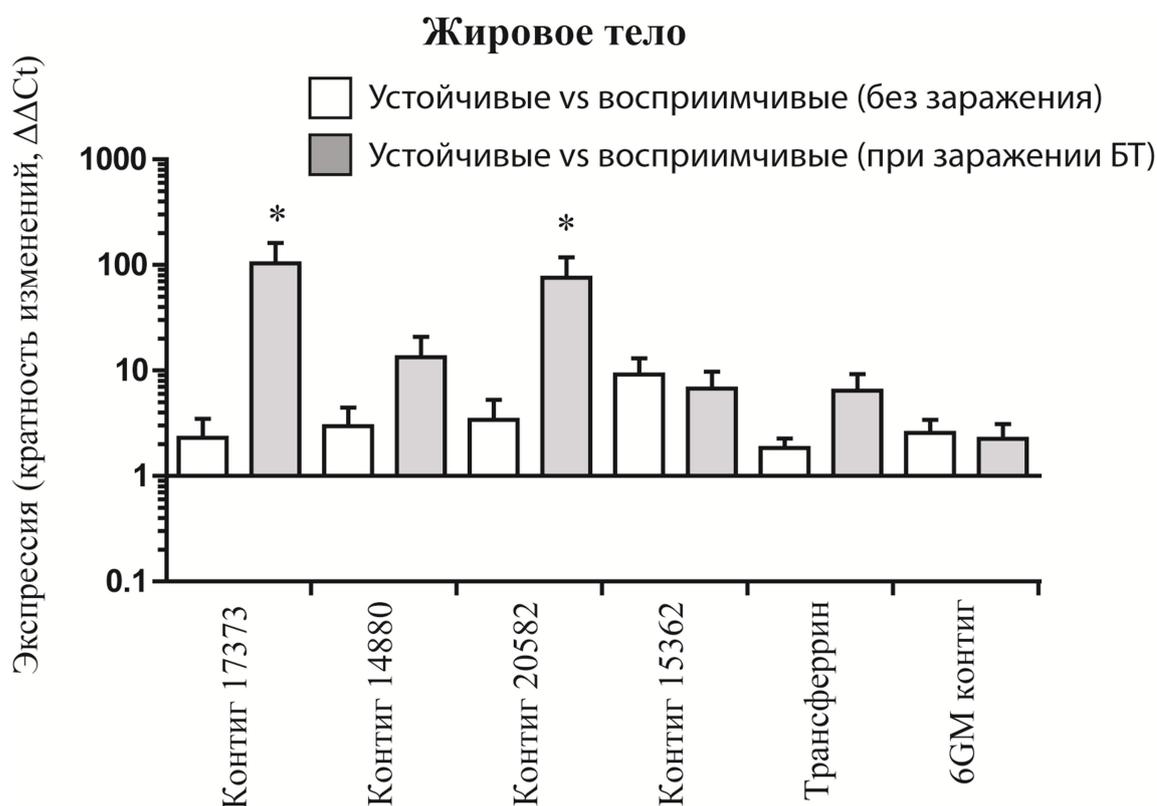


Рисунок 34. Экспрессия регуляторов ОВ баланса в жировом теле личинок вощинной огневки *G. mellonella* селектированной линии (устойчивые к БТ) и контрольной линии (восприимчивые к БТ), не зараженных и на фоне заражения полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ) (вторые сутки после заражения), данные представлены как кратность изменений в конституциональной (без заражения) экспрессии генов у устойчивых насекомых по сравнению с восприимчивыми и как кратность изменений в экспрессии у устойчивых насекомых по сравнению у восприимчивыми на фоне заражения БТ. (* $p < 0.05$ по сравнению с тем же контигом в варианте устойчивые vs восприимчивые (без заражения), $n=3$ на вариант для каждого гена)

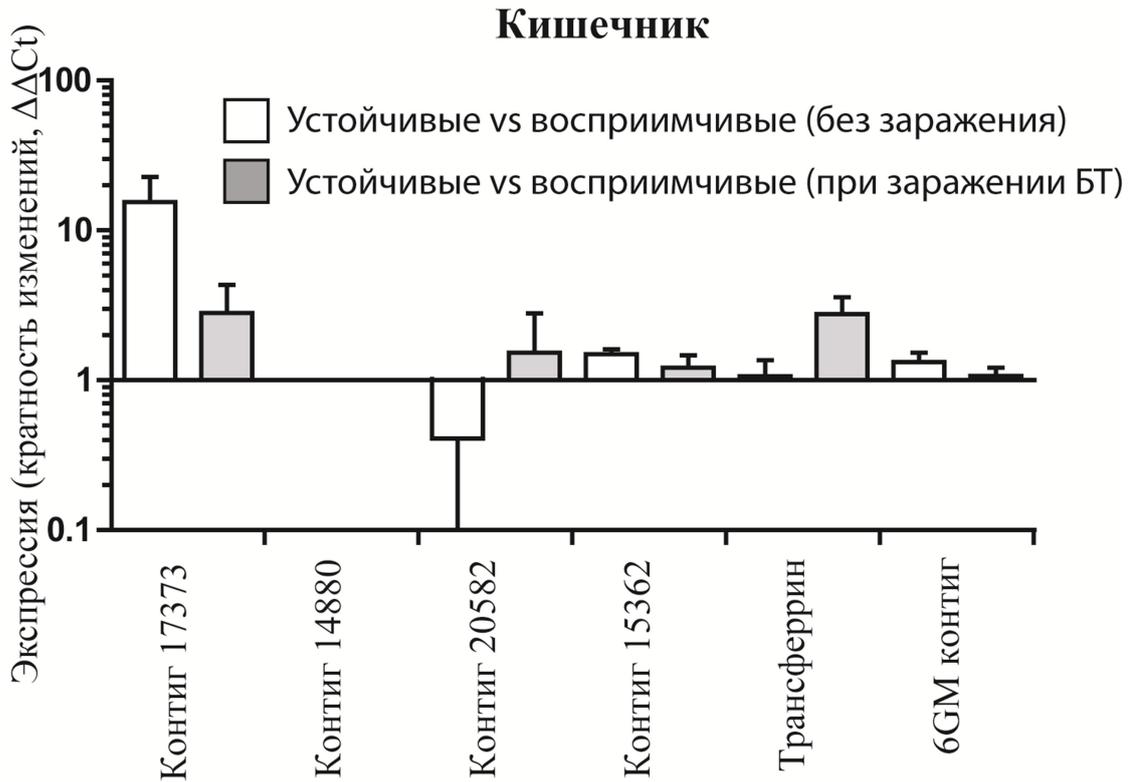


Рисунок 35. Экспрессия регуляторов ОВ баланса в среднем отделе кишечника личинок вошинной огневки *G. mellonella* селектированной линии (устойчивые к БТ) и контрольной линии (восприимчивые к БТ), не зараженных и на фоне заражения полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ) (вторые сутки после заражения), данные представлены как кратность изменений в конституциональной (без заражения) экспрессии генов у устойчивых насекомых по сравнению с восприимчивыми и как кратность изменений в экспрессии у устойчивых насекомых по сравнению у восприимчивыми на фоне заражения БТ, $n=3$ на вариант для каждого гена.

При заражении бактериями БТ было отмечено увеличение экспрессии контигов АО системы и регуляторов апоптоза у насекомых устойчивой линии. В частности, в жировом теле отмечено повышение экспрессии контига 17373, 14880, 20582 и трасферрина по сравнению с насекомыми восприимчивой линии (рисунок 36). В кишечнике повышалась экспрессия контига 20582 и трансферрина (рисунок 37). Следует отметить, что базовая экспрессия данных генов, которая

была выше у устойчивых насекомых по сравнению с восприимчивыми, при заражении увеличивалась еще больше в жировом теле (41.12 ± 16.35) (рисунок 36). В кишечнике уровень экспрессии генов АО системы тоже оставался выше у устойчивой линии по сравнению с контрольной при заражении БТ (2.07 ± 0.50) (рисунок 35).

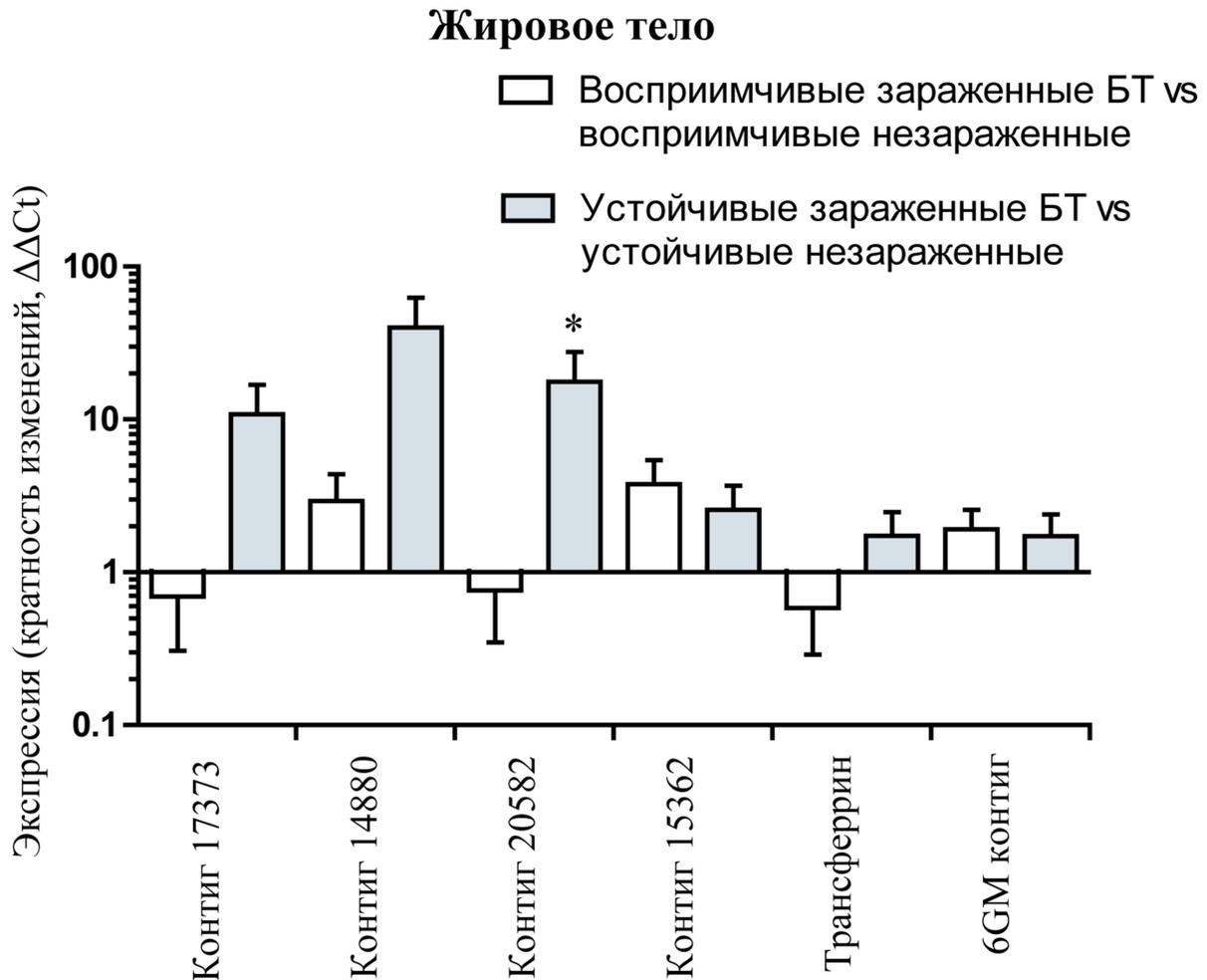


Рисунок 36. Экспрессия регуляторов ОВ баланса в жировом теле личинок *G. mellonella* селектированной линии (устойчивые к БТ) и контрольной линии (восприимчивые к БТ), на вторые сутки после заражения полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ); данные представлены как кратность изменений в экспрессии генов у зараженных насекомых по сравнению с конституциональной (без заражения) экспрессией. (* $p < 0.05$ по сравнению тем же

контигом в варианте восприимчивые зараженные БТ vs восприимчивые не зараженные, $n=3$ на вариант для каждого гена).

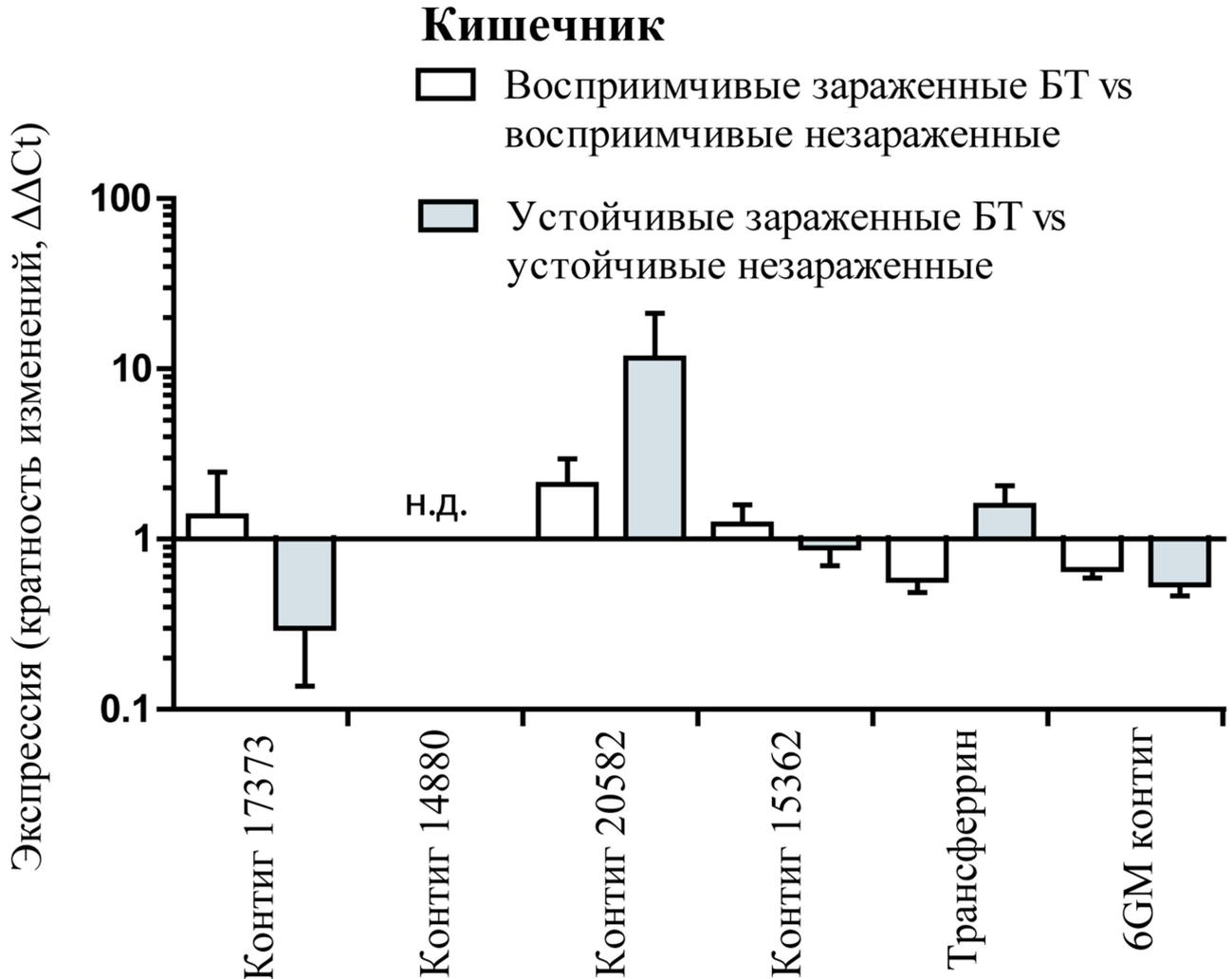


Рисунок 37. Экспрессия регуляторов ОВ баланса в кишечнике личинок *G. mellonella* селектированной линии (устойчивые к БТ) и контрольной линии (восприимчивые к БТ), на вторые сутки после заражения полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ); данные представлены как кратность изменений в экспрессии генов у зараженных насекомых по сравнению с конституциональной (без заражения) экспрессией, $n=3$ на вариант для каждого гена.

Подавление экспрессии (сайленсинг) глутатион пероксидазы (GPx) у личинок вошинной огневки при заражении БТ

Для более детального анализа вклада антиоксидантов в защиту против бактериальной инфекции, мы провели эксперимент с подавлением экспрессии (сайленсингом) глутатион пероксидазы (GPx). Было установлено, что сайленсинг GPx приводит к достоверному увеличению смертности насекомых при бактериальной инфекции БТ (рисунок 38). Это подчеркивает защитную роль антиоксидантов при бактериозе.

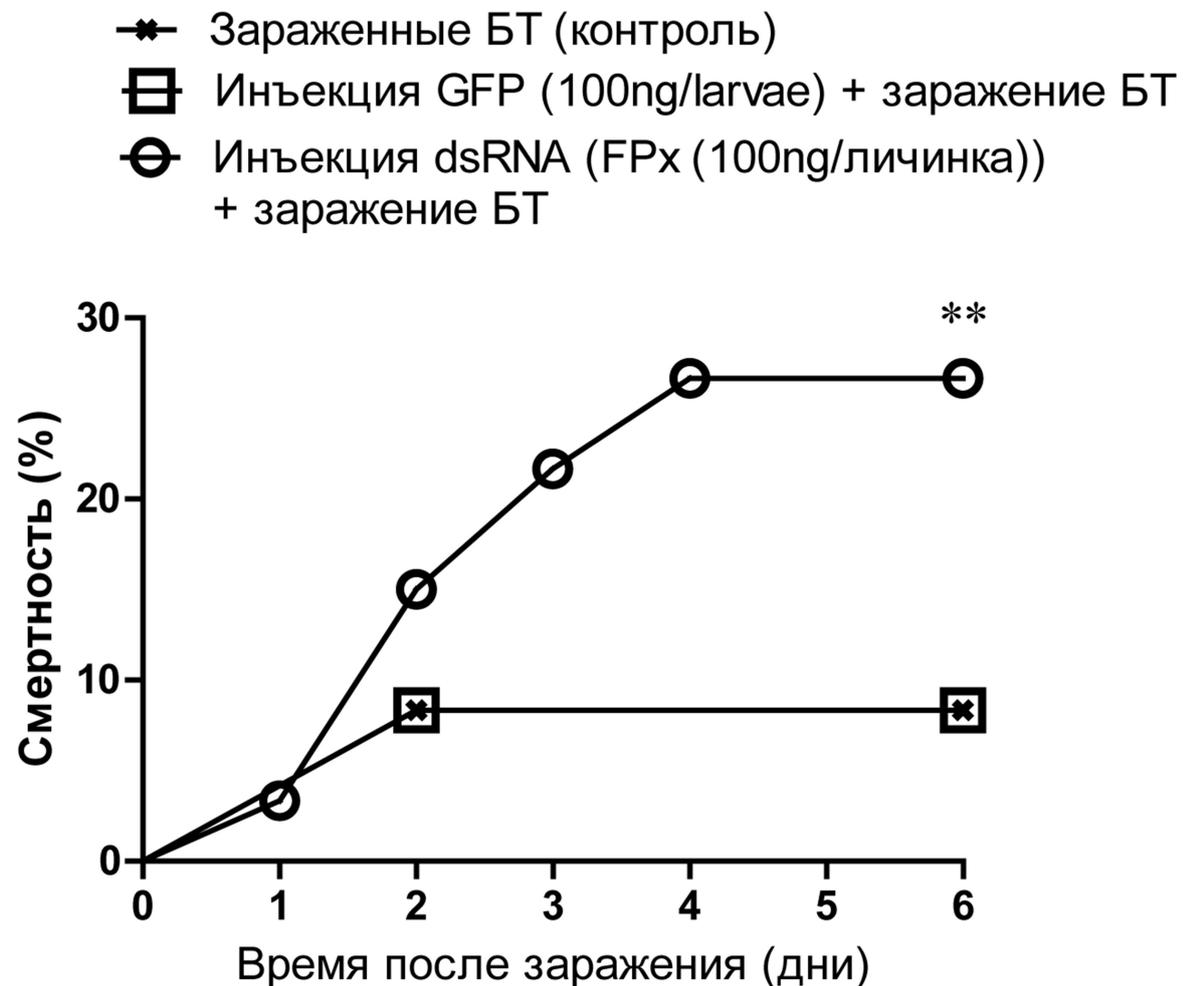


Рисунок 38. Смертность личинок вошинной огневки при заражении БТ после инъекции физраствора, интерферирующей дцРНК-GPx и дцРНК-GFP (как

дополнительного) контроля (** $p < 0.01$ по сравнению с инъекцией физраствора и дцРНК-GFP, $n=150$ на вариант).

3.6.3. Уровень экспрессии белков теплового шока при бактериозе *B. thuringiensis*

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.

БТШ являются белками, экспрессия которых начинается в ответ на рост температуры или другие клеточные стрессы (Wojda, Jakubowicz, 2007). Стресс, и в частности температура, могут влиять на фолдинг белка, а шапероны (БТШ) участвуют в исправлении потенциального вреда, который возникает из-за неправильного сворачивания белков. Другие шапероны участвуют в фолдинге только что созданных белков в тот момент, когда они «вытягиваются» из рибосомы. Следует отметить, что высокий уровень АКМ вызывает сильное повреждение белков, липидов, нуклеиновых кислот, следствием чего является некроз. Умеренный окислительный стресс вызывает программируемую гибель клетки, т.е. приводит к апоптозу. Таким образом, нарушение ОВ баланса может запускать процессы апоптоза и аутофагии в клетках животных (Зенков и др., 2001). БТШ принимают активное участие в данных процессах. Они могут восстанавливать структуру белков при стрессирующих воздействиях и таким образом регулировать процессы аутофагии и апоптоза. В данном разделе, мы рассматриваем БТШ как еще один фактор, определяющий ОВ баланс в организме насекомых при инфекции, а также как фактор устойчивости к стрессу.

По сравнению с восприимчивой линией конституциональный (базовый уровень) экспрессии генов БТШ у насекомых устойчивой линии был выше в жировом теле 2.73 ± 0.63 (рисунок 39, А) и понижен в кишечнике (рисунок 39, Б).



Рисунок 39. Экспрессия шаперонов в жировом теле (А) и среднем отделе кишечника (Б) личинок вошинной огневки *G. mellonella* селектированной линии (устойчивые к БТ) и контрольной линии (восприимчивые к БТ), не зараженных и на фоне заражения полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ) (вторые сутки после заражения), данные представлены как кратность изменений в конституциональной (без заражения) экспрессии генов у устойчивых насекомых по сравнению с восприимчивыми и как кратность изменений в

экспрессии у устойчивых насекомых по сравнению у восприимчивыми на фоне заражения БТ, $n=3$ на вариант для каждого гена.

При заражении бактериями БТ уровень экспрессии генов БТШ повышался (1.5 - 2 раза) в жировом теле (рисунок 40, А), но понижался в кишечнике (рисунок 40, Б) обеих линий.

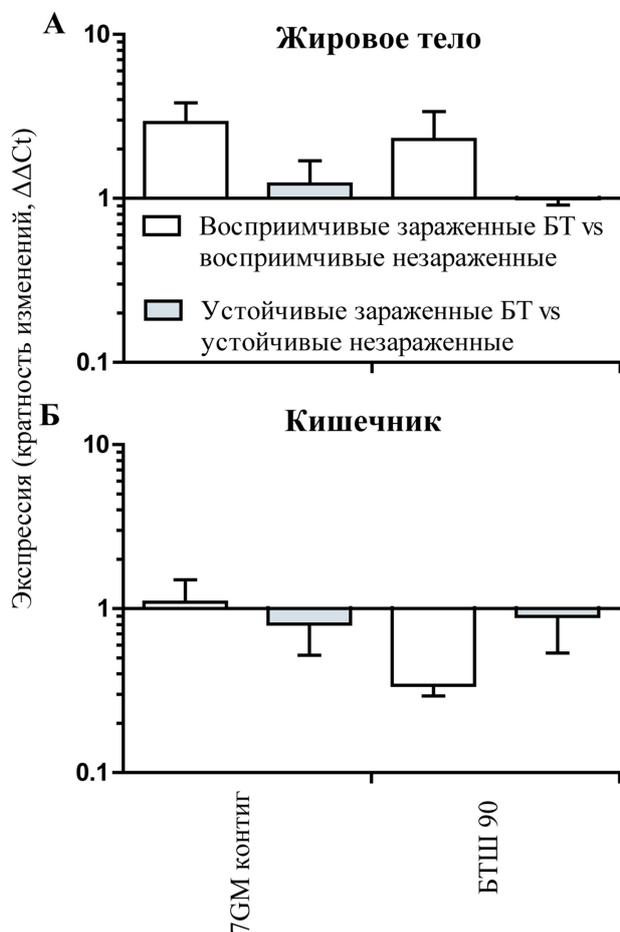


Рисунок 40. Экспрессия шаперонов в жировом теле (А) и среднем отделе кишечника (Б) личинок *G. mellonella* селектированной линии (устойчивые к БТ) и контрольной линии (восприимчивые к БТ), на вторые сутки после заражения полулетальной (ЛК50) концентрацией бактерий *B. thuringiensis* (БТ); данные

представлены как кратность изменений в экспрессии генов у зараженных насекомых по сравнению с конституциональной (без заражения) экспрессией, $n=3$ на вариант для каждого гена.

Можно предположить, что БТШ принимают участие в защите организма насекомого при бактериальной инфекции. Особенно это выражено в жировом теле зараженных насекомых. Возможно, БТШ выступают дополнительным фактором, стабилизирующим работу клеток на фоне стресса, вызванного бактериальным токсикозом. Таким образом, повышенный базовый уровень экспрессии данных генов в жировом теле устойчивых насекомых может быть адаптацией защитной системы к бактериям БТ.

В качестве заключения, хотелось бы отметить, что нарушение ОВ баланса и, в частности, возникающий окислительный стресс, являются симптомом кишечного бактериоза БТ у воцинной огневки. Вероятно, данные изменения приводят к интенсификации окислительных процессов, таких как ПОЛ, в кишечнике и могут усиливать патогенное действие БТ. Таким образом, кроме непосредственного разрушения клеток под действием Сгу-токсинов, могут возникать нарушение ОВ баланса ПОЛ, что сопровождается выбросом АКМ и, как следствие, усугублением патологического процесса. В таком случае, повышенная активность антиоксидантов является защитной реакцией, направленной на снижение концентрации АКМ и процессов ПОЛ. Отмеченная нами активация АО системы при бактериозе и увеличение смертности при подавлении экспрессии глутатион пероксидазы подтверждают эту гипотезу. Анализ АО системы у линии воцинной огневки с повышенной устойчивостью к БТ также свидетельствует что устойчивость сопряжена с повышением базового уровня экспрессии АО генов в кишечнике и жировом теле и пониженным ОВ балансом. Это стратегия «быть подготовленным» к инфекции в случае бактериоза

БТ, вероятно, является эффективной, потому что воздействие токсинов на клетки эпителия и продуцируемые при этом АКМ быстро инактивируются, и не тратится время на экспрессию антиоксидантов.

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

Развитие бактериоза БТ может сопровождаться изменением состава микрофлоры в кишечнике и в том числе заменой доминантных видов (Broderick et al., 2010; Richards, Dani, 2010; Shrestha et al., 2010; Hwang, Kim, 2011). На данный момент известно, что кишечная микрофлора может быть дополнительным фактором усиливающим вирулентность БТ (Broderick et al., 2006), однако роль микрофлоры в патогенности БТ все еще обсуждается (Johnston, Crickmore 2009; van Frankenhuyzen et al., 2010). Для изучения состава кишечных бактерий воцинной огневки мы использовали таксономическую классификацию по V3-V4 региону 16S рРНК с помощью секвенирования. В кишечнике личинок восприимчивой и устойчивой к БТ линий доминировали бактерии нескольких филумов. В частности, 99.5% сообщества было представлено четырьмя филумами: Firmicutes ($80.7 \pm 6.3\%$), Proteobacteria ($11.8 \pm 4.5\%$), Actinobacteria (3.9 ± 1.6) и Bacteroidetes (3.1 ± 1.1) (рисунок 41, А). Достоверных отличий в соотношении бактерий на уровне филумов и классов между линиями не было. Однако, у нативных личинок устойчивой линии было больше бактерий рода *Enterobacter* в сравнении с восприимчивой (рисунок 44, А).

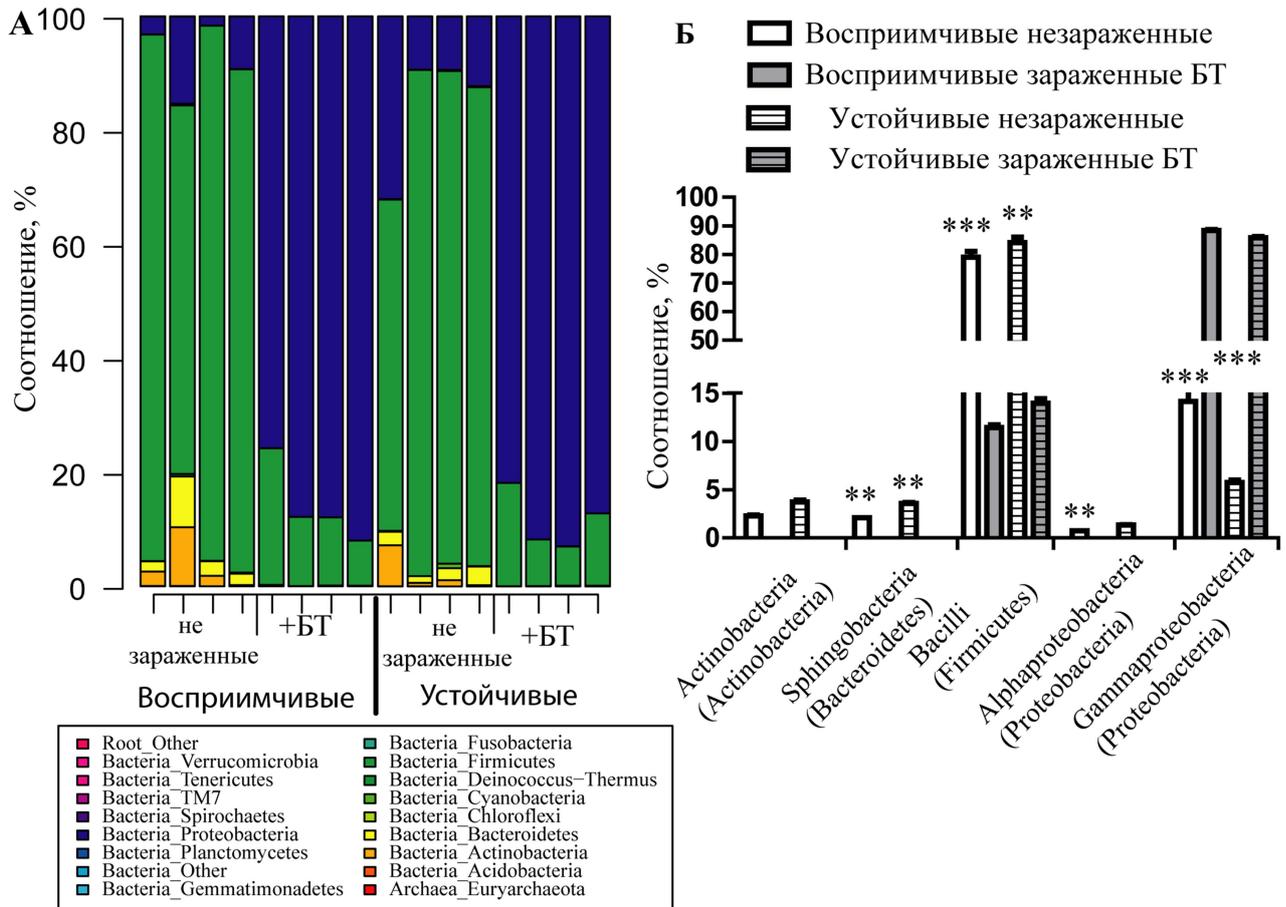


Рисунок 41. Состав микрофлоры в кишечнике личинок селектированной линии (устойчивые к БТ) и контрольной линии (восприимчивые к БТ) на вторые сутки при заражении бактериями БТ. Бактерии классифицированы до филумов (А) (каждый вариант представлен в четырех повторностях). (Б) Бактерии классифицированные до типов и классов (повторности каждой колонки сгруппированы соответственно варианту) (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с зараженными, $n=4$ на вариант).

Инфицирование личинок обеих линий бактериями БТ приводило к значительному сдвигу в составе микрофлоры от *Firmicutes* ($80.7 \pm 6.3\%$) к *Proteobacteria* ($86.3 \pm 2.6\%$) ($p < 0.001$) (рисунок 41, А, Б). Отличий между линиями

на уровне типов и классов не было. Хотя у зараженных личинок устойчивой линии было отмечено меньше бактерий рода *Pseudomonas* ($p < 0.05$) (рисунок 42, Б). Следует отметить, что семейство *Bacillaceae*, к которому относятся бактерии *Bacillus thuringiensis* было лишь незначительно увеличено среди сообщества после заражения БТ (2-3%) (рисунок 43, Б).

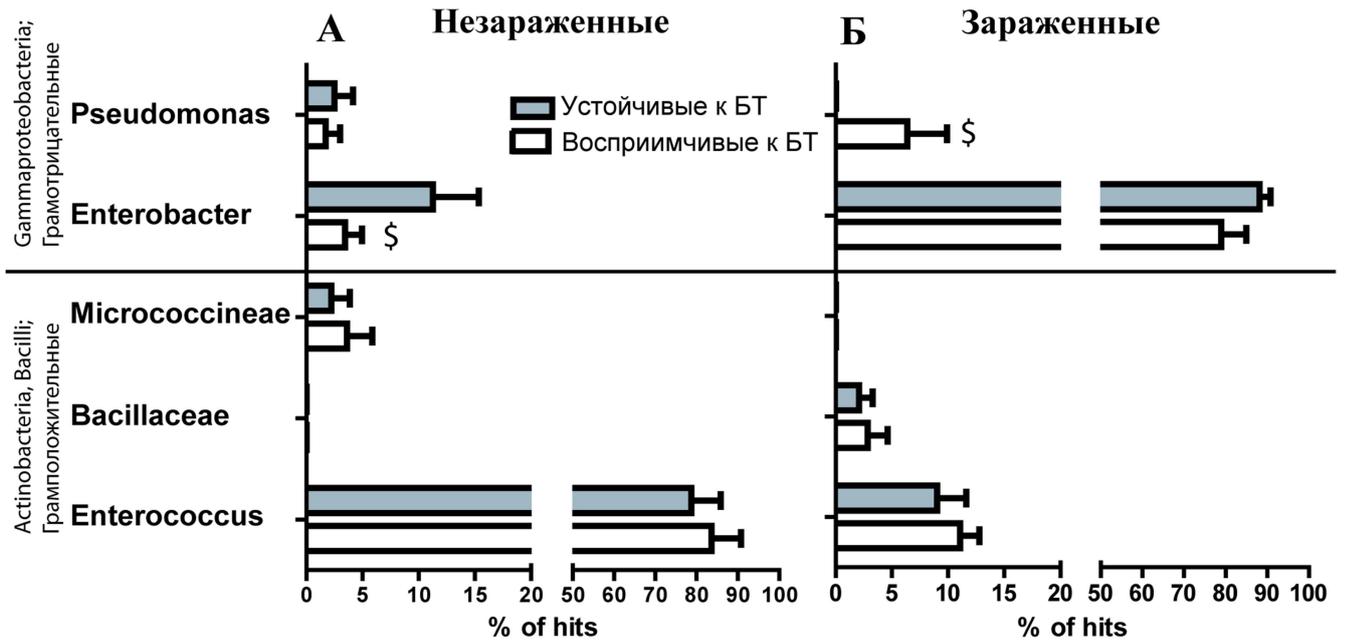


Рисунок 44. Соотношение семейств и родов бактерий микрофлоры в кишечнике личинок селектированной линии (устойчивые к БТ) и контрольной линии (восприимчивые к БТ), нативных (А) и на вторые сутки при заражении бактериями БТ (ЛК50) (Б). (§ $p < 0.05$ по сравнению с бактериями того же рода у устойчивых насекомых, $n=4$ на вариант).

Следует отметить, что в кишечниках насекомых устойчивой линии происходило достоверное снижение биоразнообразия бактерий при заражении

БТ. Снижалось число флотипов бактерий (индекс Chao) (рисунок 45, А) и их распределение (индекс Shannona) (рисунок 45, Б).

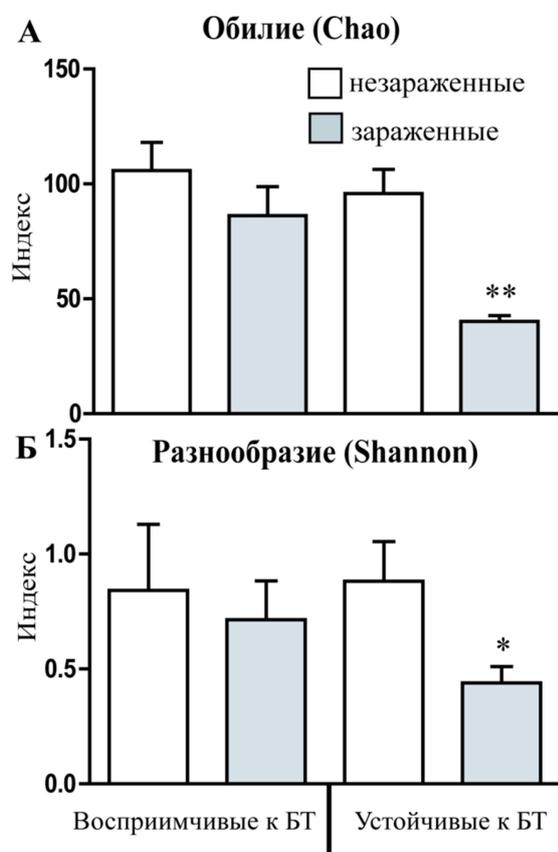


Рисунок 45. Обилие (А) и разнообразие (Б) бактериального сообщества у личинок вощинной огневки селективной линии (устойчивые к БТ) и контрольной линии (восприимчивые к БТ) на вторые сутки после заражения БТ (** $p < 0.01$ по сравнению с остальными вариантами; * $p < 0.05$ по сравнению с незараженными личинками той же линии, $n=4$ на вариант).

Полученные результаты свидетельствуют, что развитие бактериоза БТ приводит к резким изменениям в составе кишечной микрофлоры. Происходит кардинальная смена доминантных видов. Данные изменения могут быть связаны с несколькими причинами. Для прорастания спор, бактериям БТ необходимы определенные условия, которые могут не подходить для бактерий *Enterococcus*

(Raymond et al., 2009; Nielsen-LeRoux et al., 2012). На начальных этапах инфекции эти условия могут формироваться из-за действия Сгу-токсинов. С одной стороны Сгу-токсины действуют на эпителиальные клетки, что вполне закономерно приводит к смещению общего сообщества в кишечнике. С другой стороны, токсины могут непосредственно действовать на других членов микробного сообщества. Кроме того, как только клетки БТ начинают прорастать, во внешнюю среду, синтезируются метаболиты, которые могут быть агрессивны к другим бактериям, то есть проявлять как бактериостатические, так и бактериолитические свойства. Одновременно, в результате взаимодействия токсинов и эпителиальных клетках кишечника происходит накопление АМБ. Выброс АМБ в кишечнике в ответ на БТ инфекцию может влиять на состав микрофлоры. Все эти причины по отдельности или вместе могут приводить к наблюдаемым нами изменениям в составе микрофлоры при бактериозе, а также снижению ее разнообразия у устойчивых насекомых.

Заключение к главе 3

Наше исследование свидетельствует, что у вошинной огневки может формироваться резистентность к бактериям БТ при помощи комплекса многофакторных иммуно-физиологических адаптаций, ограничивающих как воздействие токсинов, так и клеток бактерий на организм. Мы сфокусировали внимание не только на таких хорошо известных адаптациях, как изменение рецепторных для токсина молекул в кишечнике (Jurat-Fuentes, Adang, 2004; Herrero et al., 2005; Gahan et al., 2001), но и на ряде других возможных адаптаций насекомых. Обе линии вошинной огневки (устойчивая и восприимчивая к БТ) демонстрировали широкий репертуар конституциональных и индуцибельных защитных реакций иммунной и антиоксидантной системы, а также регенерационных процессов при бактериозе. Однако у личинок устойчивой линии большая часть защитных реакций имела более высокий конституциональный

уровень, а также более выраженный ответ на заражение БТ, который приводил к снижению разнообразия и численности бактериального сообщества, в том числе условно-патогенных бактерий в кишечнике.

Адаптации защитной системы насекомых к БТ можно разделить на несколько ключевых систем, которые направлены на различные компоненты или стадии инфекции БТ. Часть защитных систем направлены непосредственно на бактериальные токсины, а часть - на вегетативные клетки бактерий.

Хорошо известно, что основной фактор вирулентности БТ - это бактериальный эндотоксин, активируемый протеазами хозяина и металлопротеазами бактерии (Oppert, 1999). Мы считаем, что одним из первых уровней защиты к БТ будет повышенный синтез ингибиторов определенных групп протеаз, который может существенно нарушать активацию Сгу-токсинов из протоксинов. В частности, мы впервые обнаружили, что у устойчивых к БТ насекомых повышен конституциональный (базовый) уровень экспрессии индуцибельного ингибитора металлопротеаз. Кроме того, его экспрессия увеличивалась после заражения БТ у обеих линий. Базовый уровень IMP1 может быть крайне важным на начальном этапе заражения, когда после растворения кристалла происходит протеолиз Сгу белков. Если протеолиз будет ограничен, за счет блокирования протеазной активности, то произойдет снижение концентрации активированного токсина. Кроме того, у устойчивых насекомых мы обнаружили снижение активности аминопептидаз и щелочных фосфатаз, которые являются рецепторами для Сгу токсинов. Это может служить дополнительным фактором, приводящим к снижению связывания Сгу белков с поверхностью эпителиальных клеток.

Воздействие токсинов БТ, как Сгу-токсинов, так и продуцируемых вегетативными клетками бактерий (фосфолипаз, гемолизинов и некоторых энтеротоксинов) приводит к разрушению клеток кишечника (Gill et al., 1992). Замена разрушенных клеток и репаративные процессы в поврежденных могут быть важным фактором, обеспечивающим выздоровление насекомых. При

заражении БТ увеличение регенерационных процессов происходило у обеих линий как в кишечнике, так и в жировом теле. Однако, у устойчивых насекомых мы зафиксировали повышенный базовый уровень факторов роста в кишечнике, который при заражении БТ сохранялся на более высоком уровне по сравнению с восприимчивыми. Более того, при развитии инфекции у устойчивых насекомых повышалась экспрессия факторов роста в жировом теле, что является свидетельством активных регенеративных и репарационных процессов. Несомненно, данные системы играют ключевую роль как в локальной (в кишечнике), так и при системной (в жировом теле) защите насекомых при бактериозе, а их адаптивные реакции являются ключевыми при микроэволюционном формировании резистентности к БТ.

При связывании БТ токсина с поверхностью эпителиальных клеток происходит нарушение свойств их мембран, что приводит к активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и нарушению окислительно-восстановительного (ОВ) баланса. В процессе данных нарушений одним из токсичных для организма насекомых факторов могут выступать АКМ. Свидетельства участия АКМ в кишечных бактериозах также получены на мухах *Drosophila* при пероральном заражении другими бактериями (р. *Erwinia*) (Broderick et al., 2009). Личинки устойчивой линии обладали повышенным базовым уровнем активности антиоксидантов (АО) как в кишечнике, так и в жировом теле. Кроме того, при заражении у них происходила более выраженная активация АО системы. Таким образом, полученные данные подтверждают гипотезу о том, что АО система насекомых является важным звеном противобактериальной защиты, участвующей в инактивации токсичных, высокорекреационных продуктов, образующихся при бактериальном патогенезе.

Нарушение целостности кишечника токсинами БТ создает возможность бактериальным клеткам и микрофлоре проникнуть в гемоцель. После чего происходит септицемия и насекомое погибает. Полученные нами результаты свидетельствуют, что повреждения кишечника могут запускать ряд сигнальных

путей активации иммунной системы. Вероятно, гемоциты и связанные с ними 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 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 бактерии кишечной микрофлоры, которые также могут представлять опасность для насекомого при патогенезе БТ. Кроме того, АМБ могут способствовать активации всего комплекса защитных реакций насекомого за счет более раннего разрушения БТ бактерий, компоненты которых могут выполнять иммуностимулирующие функции. Таким образом, вероятно, одним из направлений эволюции резистентности к БТ, является увеличение конституционального и индуцибельного гуморального звена иммунитета – АМБ.

В заключении хотелось бы отметить, что мы обнаружили целый комплекс иммуно-физиологических адаптаций насекомых при формировании резистентности к БТ. Следует отметить, что ключевые адаптации были связаны с начальными этапами инфекции и сосредоточены в кишечнике насекомых. Комплексная защита повышала устойчивость насекомых и приводила к снижению биоразнообразия бактериального сообщества в кишечнике. Таким образом, эволюция защитных реакций, связанных с кишечником, направлена на повышение их базовой активности и стратегией «быть подготовленным», и по-видимому, их адаптивная ценность заключается в быстрой инактивации факторов вирулентности БТ. Все эти адаптации не приводят к снижению морфометрических показателей насекомых, что является свидетельством

отсутствия выраженного влияния на морфометрические показатели на начальном этапе адаптиогенеза.

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

Коэволюция насекомых и энтомопатогенных грибов привела к формированию определенных защитных стратегий насекомых. Ряд противогрибных адаптаций у насекомых связан с покровами. В частности, фунгистатические жирные кислоты, фенолоксидазы (ФО) и меланины играют важнейшую роль в защитных реакциях кутикулы, в первую очередь препятствуют проникновению гриба в организм насекомого (St. Leger et al., 1988). Как только гриб «проходит» кутикулярный барьер, запускаются защитные реакции в гемоцеле, но в большинстве случаев при проникновении через кутикулу гриб способен полностью подавить иммунную систему хозяина (Hajek, St. Leger, 1994). В связи с этим, кутикула считается одной из важнейших структур, защищающих от грибных энтомопатогенов. Следует отметить, что свойства кутикулы как барьера для грибов будут складываться из нескольких составляющих. В первую очередь, это состав эпикутикулы, где ключевую роль будут играть жирные кислоты и воска, определяющие фунгистатические и гидрофобные свойства. Во вторую, это степень склеротизации и меланизации кутикулы. Два компонента – меланин и склеротин, образуются из одной аминокислоты – тирозина, в результате окисления, гидроксирования и аминирования. Но на наш взгляд, основную роль в противогрибных реакциях будет играть меланин. Следует отметить, что степень меланизации может значительно варьировать во многих популяциях насекомых, а толщина и, соответственно, степень склеротизации может меняться несущественно.

В связи с этим, основное внимание в нашей работе мы уделяли выявлению корреляции между восприимчивостью насекомых к грибам и степенью меланизации кутикулы насекомых. Об уровне склеротизации судили косвенно по толщине кутикулы. Меланин образуется в ходе меланогенеза посредством ФО (Cerenius, Söderhäll, 2004) и определяет твердость и цвет кутикулы, а также

антимикробные свойства (Andersen, 2010). Кроме того, меланин и продукты меланогенеза ограничивают развитие грибов, действие их токсинов и ферментов (Söderhäll, Ajaxon, 1982; St. Leger et al., 1988). Темные, меланистические морфы насекомых обладают высокой концентрацией меланина в кутикуле и демонстрируют положительную корреляцию между меланизмом, ФО активностью и устойчивостью к различным паразитам, включая грибы *B. bassiana* и *Metarhizium anisopliae* (Barnes, Siva-Jothy, 2000; Wilson et al., 2001; Wilson et al., 2002). Индуцированный меланизм часто наблюдается при высокой плотности насекомых (саранчовые, различные совки, луговой мотылек и т.д.) и направлен на уменьшение риска развития инфекции и эпизоотии (так называемый density-dependent prophylaxis) (Wilson, Reeson, 1998; Barnes, Siva-Jothy, 2000; Wilson et al., 2001; Wilson et al., 2002). К сожалению, устойчивость насекомых к различным энтомопатогенам изучалась в основном при индуцированном меланизме вызванном высокой плотностью насекомых (Wilson et al., 2001; Wilson et al., 2002; Cotter et al., 2004). Хотя известно, что в популяции насекомых практически всегда присутствует определенная часть меланистических форм. Более того, при определенных условиях могут формироваться целые популяции меланистов. Однако, изучение врожденного меланизма насекомых как адаптации к энтомопатогенам практически не проводилось. Неизвестным остается участие кутикулярных, клеточных и гуморальных защитных реакций при микозах у меланистов.

Для изучения противогрибной стратегии насекомых с повышенным меланизмом были использованы внутривидовые морфы вошинной огневки с различной степенью меланизации кутикулы. На насекомых меланистической и светлой морф был проведен комплекс исследований кутикулярных, клеточных и гуморальных защитных реакций при грибной инфекции, а также морфометрических и популяционных показателей, для определения «цены» повышенной устойчивости к грибам для меланистов.

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

Объектом исследований служили личинки большой вощинной огневки *Galleria mellonella* лабораторной популяции, собранной в Новосибирской области, обладающие темной окраской кутикулы. В качестве ахромистов была взята морфа со светлой окраской кутикулы, привезенная из Великобритании (рисунок 46, А).

Устойчивость к перкутанному заражению

При топикальном (перкутанном) заражении личинок меланистической и ахромистической морф (рисунок 46, А) была зафиксирована повышенная устойчивость меланистов к грибу *B. bassiana* по сравнению с ахромистами (рисунок 46, Б) (для 5×10^5 / мл, $p = 0.0083$; для 5×10^6 / мл, $p < 0.0001$; для 5×10^7 / мл, $p < 0.001$). Коэффициент резистентности, (RR) – частное при делении ЛК50 меланистов на ЛК 50 ахромистов, составлял 12.91.

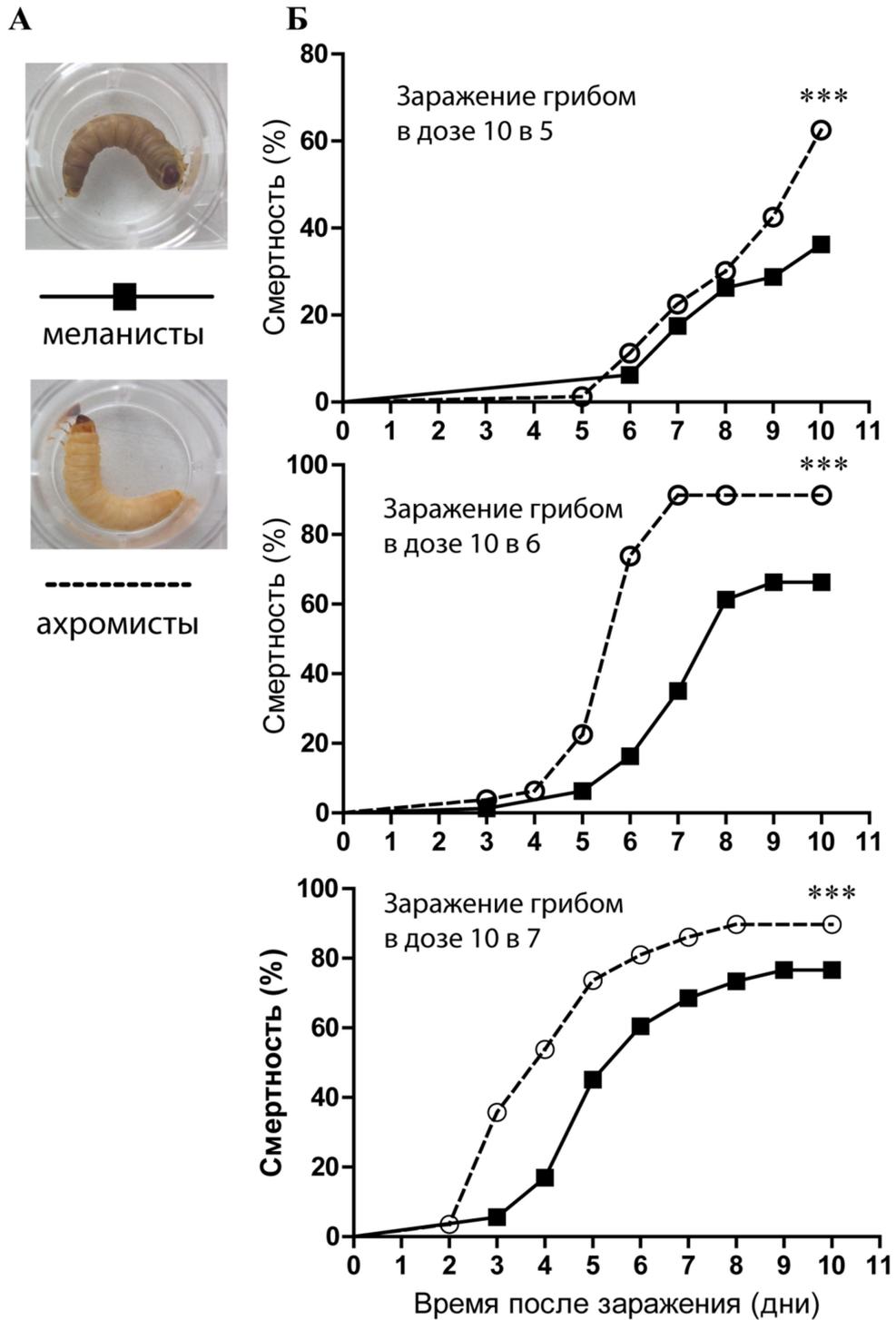


Рисунок 46. Кутикулярный меланизм и цветовые морфы воцинной огневки (А), а также восприимчивость меланистической (меланисты) и светлой (ахромисты) морф к различным дозам гриба *B. bassiana* (Б) (***) $p < 0.001$ по сравнению с ахромистами, $n=200$ на вариант).

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. В связи с этим очень важно, будет ли меняться гидрофобность кутикулы при формировании меланистических морф. Также поверхностные жирные кислоты и воска могут ингибировать рост уже адгезировавшихся конидий. При анализе адгезии конидий мы не обнаружили достоверных отличий между меланистами и ахромистами (рисунок 47, А). При изучении влияния состава эпикутикулярных экстрактов мы также не обнаружили отличий между морфами (рисунок 47, Б). Активация конидий на кутикуле личинок тоже не отличалась между морфами и активно происходила в первые 24 часа после заражения (Таблица 1). Однако, проникновение гриба в гемоцель через 48 часов после заражения грибом было достоверно выше у ахромистов (Таблица 1). В частности проникновение гриба в кутикулу было в 1.7 раза больше у ахромистов ($p = 0.0016$), колонизация гемолимфы была также выше у ахромистов (65% vs. 10%) ($p = 0.0003$).

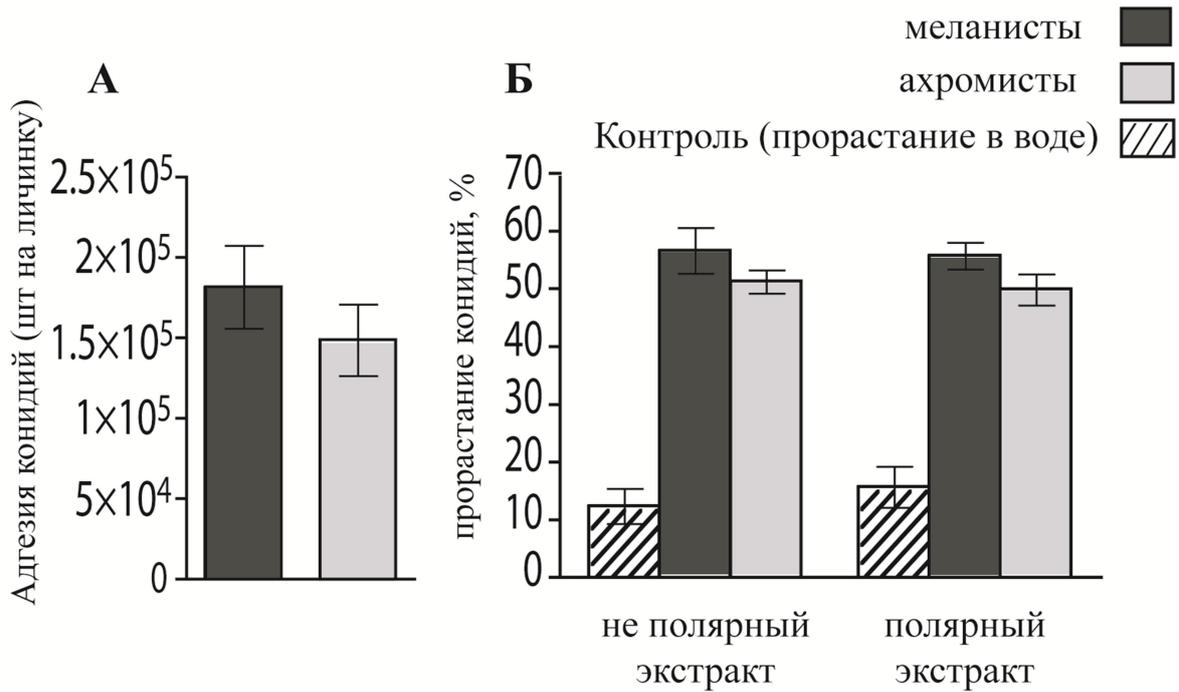


Рисунок 47. Адгезия конидий *B. bassiana* к поверхности кутикулы личинок меланистической (меланисты) и светлой (ахромисты) морф через 6 ч после заражения (А) и *in vitro* прорастание конидий через 36 часов инкубации с полярным и не полярным экстрактом компонентов эпикутикулы (n=30 на вариант).

Таблица 1

Развитие микоза у личинок меланистической (М) и светлой (А) морф воцинной огневки *G. mellonella* после перкутанного заражения грибом *B. bassiana*.

Время, после заражения (ч)	М	А	М	А	М	NA
	<i>Прорастание*</i> %		<i>Проникновение**</i> %		<i>Колонизация гемолимфы***</i> %	
9ч	0	0	0	0	н.д.	н.д.
12ч	33	36	27	23	н.д.	н.д.
24ч	83	55	45	45	0	0
48h	100	100	53 ($p < 0.01$)	90	10 ($p < 0.001$)	65

*Прорастание конидий представлено как процент личинок на которых произошла прорастание 50% конидий (n=30). **Проникновение конидий представлено как процент личинок на которых произошло прорастание конидий в десяти или более местах в кутикуле (n=30). ***Колонизация гемолимфы представлена как процент личинок у которых детектировали бластоспоры гриба в гемолимфе (n=20). Достоверность различий представлена по сравнению с ахромистами на ту же временную точку.

Общеизвестно, что на скорость проникновения гриба в организм насекомого может влиять толщина кутикулы. Кутикула личинок меланистов была достоверно толще чем у ахромистов (48.4 ± 1.5 мкм vs 32.4 ± 1.9 мкм) ($p < 0.0001$) (Рисунок 48, 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, то есть скорость их активации. Конституционный уровень ФО в покровах был одинаков у обеих морф (Рисунок 48, Б). Хотя, на ранних этапах микоза (12-24 часа после заражения) ФО активность в покровах меланистов была выше, чем у ахромистов ($p < 0.05$) (Рисунок 48, Б). К 48 часам, активность ФО снижалась до контрольных значений у личинок обеих морф.

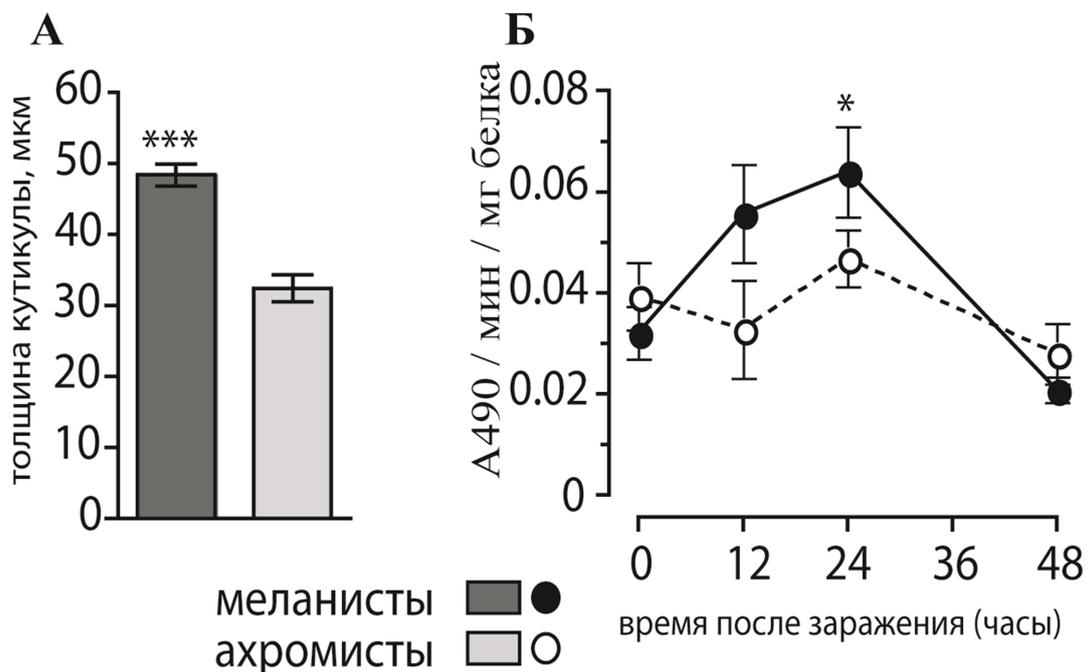


Рисунок 48. Толщина кутикулы у личинок меланистической (меланисты) и светлой (ахромисты) морф вошинной огневки (А) ($***p < 0.0001$ по сравнению с ахромистами, $n=30$ на вариант). Активность ФО в покровах различных морф

насекомых при развитии микоза *B. bassiana* (Б). (* $p < 0.05$ по сравнению с ахромистами, $n=30$ на вариант на каждую временную точку).

Полученные результаты свидетельствуют, что у меланистов нет адаптаций, позволяющих избегать контакта с конидиями гриба за счет состава эпикутикулы. Однако, меланисты обладают утолщенной кутикулой и повышенным ответом ФО в покровах. Эти анатомические и физиологические особенности, вероятно, могут существенно снижать скорость развития и выживаемость гриба в кутикуле.

4.3. Клеточный и гуморальный иммунный ответ личинок меланистической и ахромистической морф

Любое повреждение кутикулы, в том числе и гифами грибов, будет запускать иммунный ответ. В частности, гемоциты могут скапливаться в районе повреждения, формируя клампы, дегранулировать и запускать процесс инкапсуляции. Мы не обнаружили отличий в базовом уровне инкапсуляции между меланистической (меланисты) и светлой (ахромисты) морфами личинок воцинной огневки. Однако на 24 и 48 часов после заражения грибом было отмечено резкое увеличение активности инкапсуляции у меланистов ($p < 0.01$ и $p < 0.001$ соответственно) (рисунок 49). При этом у ахромистов не только не отмечено повышения инкапсуляции, но даже происходило ее достоверное снижение по сравнению с незараженными на 2 сутки микоза ($p < 0.001$) (рисунок 49).

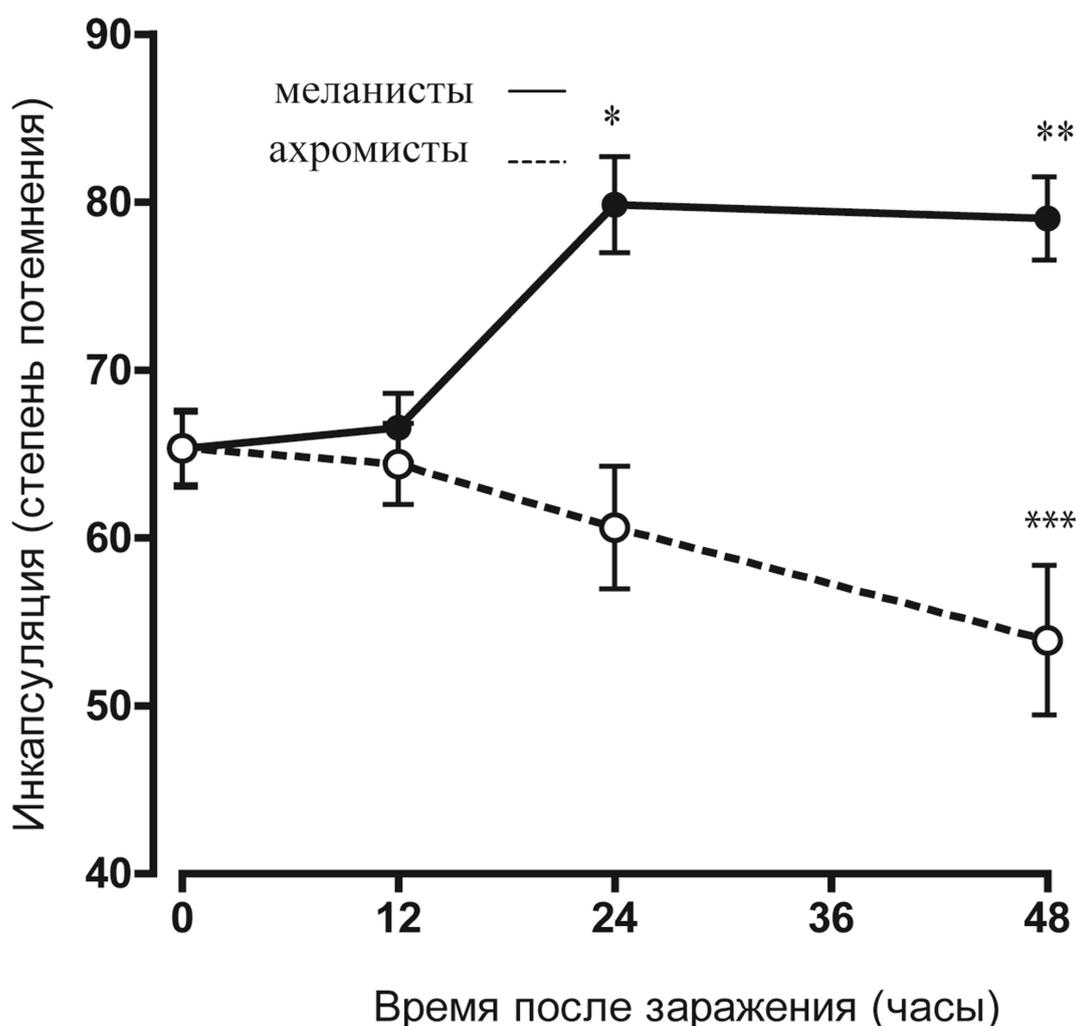


Рисунок 49. Интенсивность инкапсуляции у личинок меланистической (меланисты) и светлой (ахромисты) морф вошинной огневки *G. mellonella* при заражении грибом *B. bassiana* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с незараженными личинками (0 часов) той же морфы, $n=120$ на вариант на каждую временную точку).

У личинок меланистов была отмечена большая концентрация гемоцитов в гемолимфе по сравнению с ахромистами ($5.1 \times 10^7 / \text{мл} \pm 2.2 \times 10^6 / \text{мл}$ vs $2.3 \times 10^7 / \text{мл} \pm 1.8 \times 10^6 / \text{мл}$; $p < 0.001$) (рисунок 50). Однако, при заражении грибом концентрация гемоцитов у меланистов достоверно снижалась ($p < 0.001$) (рисунок 50). У ахромистов напротив, происходило увеличение концентрации гемоцитов на начальных этапах инфекции ($p < 0.001$) (рисунок 50).

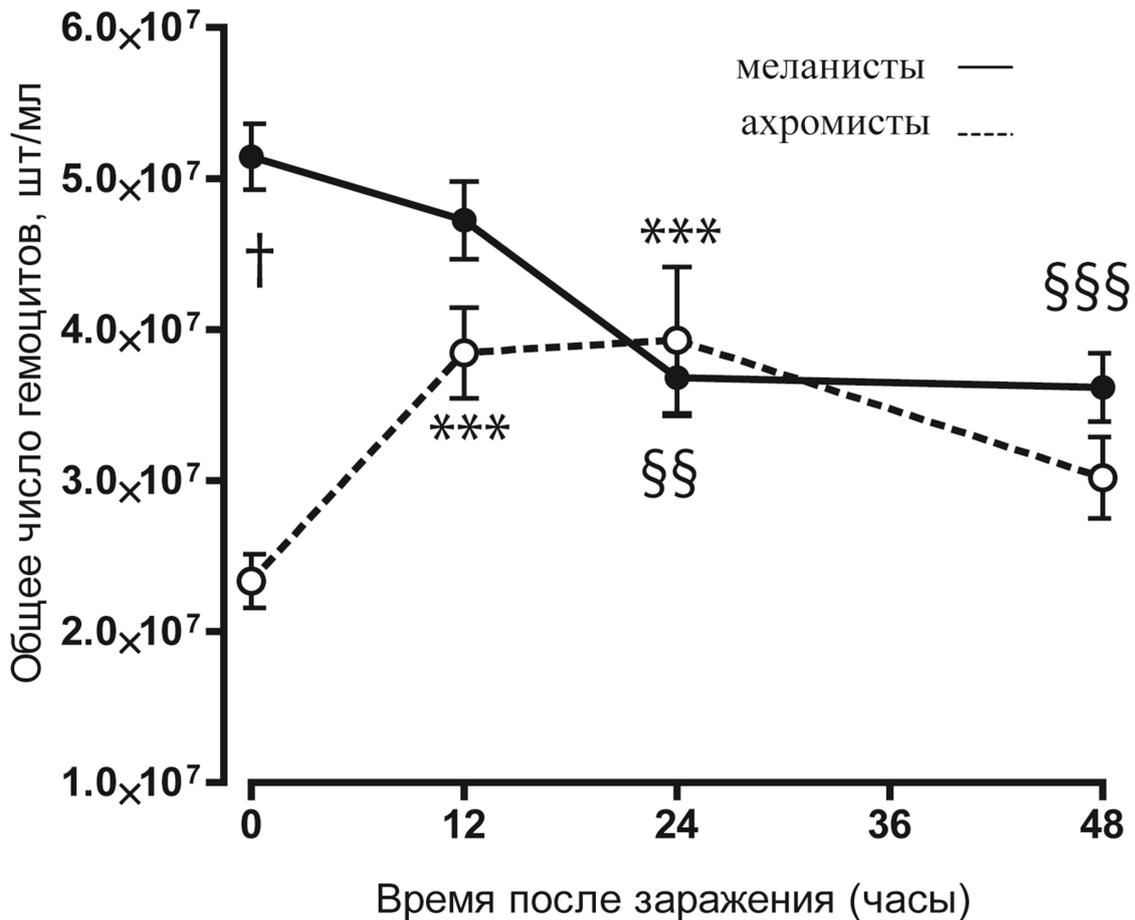


Рисунок 50. Общее число гемоцитов в гемолимфе личинок меланистической (меланисты) и светлой (ахромисты) морф вошинной огневки *G. mellonella* при заражении грибом *B. bassiana* († = $p < 0.001$ по сравнению с незараженными ахромистами, *** = $p < 0.001$ по сравнению незараженными личинками меланистов, §§ = $p < 0.01$, §§§ = $p < 0.001$ по сравнению с незараженными личинками ахромистов, $n=30$ на вариант на каждую временную точку).

ФО активность в гемолимфе незараженных личинок ахромистов была достоверно выше, чем у меланистов ($p < 0.05$) (рисунок 51). У личинок обеих морф происходило резкое увеличение ФО активности на 12 часов после заражения грибом ($p < 0.05$), после чего активность сохранялась на уровне контроля (рисунок 51).

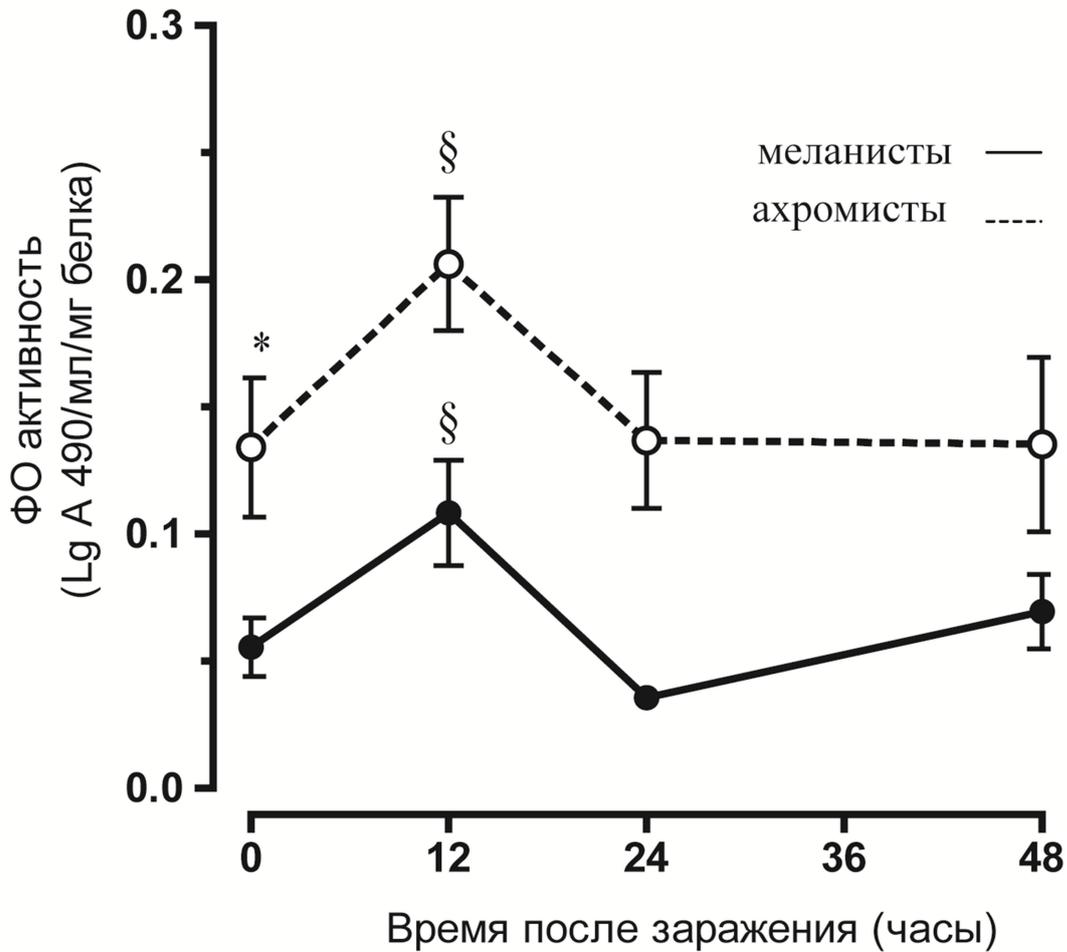


Рисунок 51. ФО активность в плазме гемолимфы личинок меланистической (меланисты) и светлой (ахромисты) морф вошинной огневки *G. mellonella* при заражении грибом *B. bassiana* (* $p < 0.05$ по сравнению с незараженными меланистами, § $p < 0.05$ по сравнению с незараженными личинками своей морфы, $n=60$ на вариант на каждую временную точку).

Лизоцим-подобная активность в гемолимфе нативных личинок обеих линий была одинаковой (рисунок 52). Интересно, что при заражении происходило увеличение лизоцим-подобной активности у ахромистов ($p < 0.01$ на 12 ч $p < 0.01$ на 24 ч; и $p < 0.001$ на 48 ч), но не у меланистов (рисунок 52).

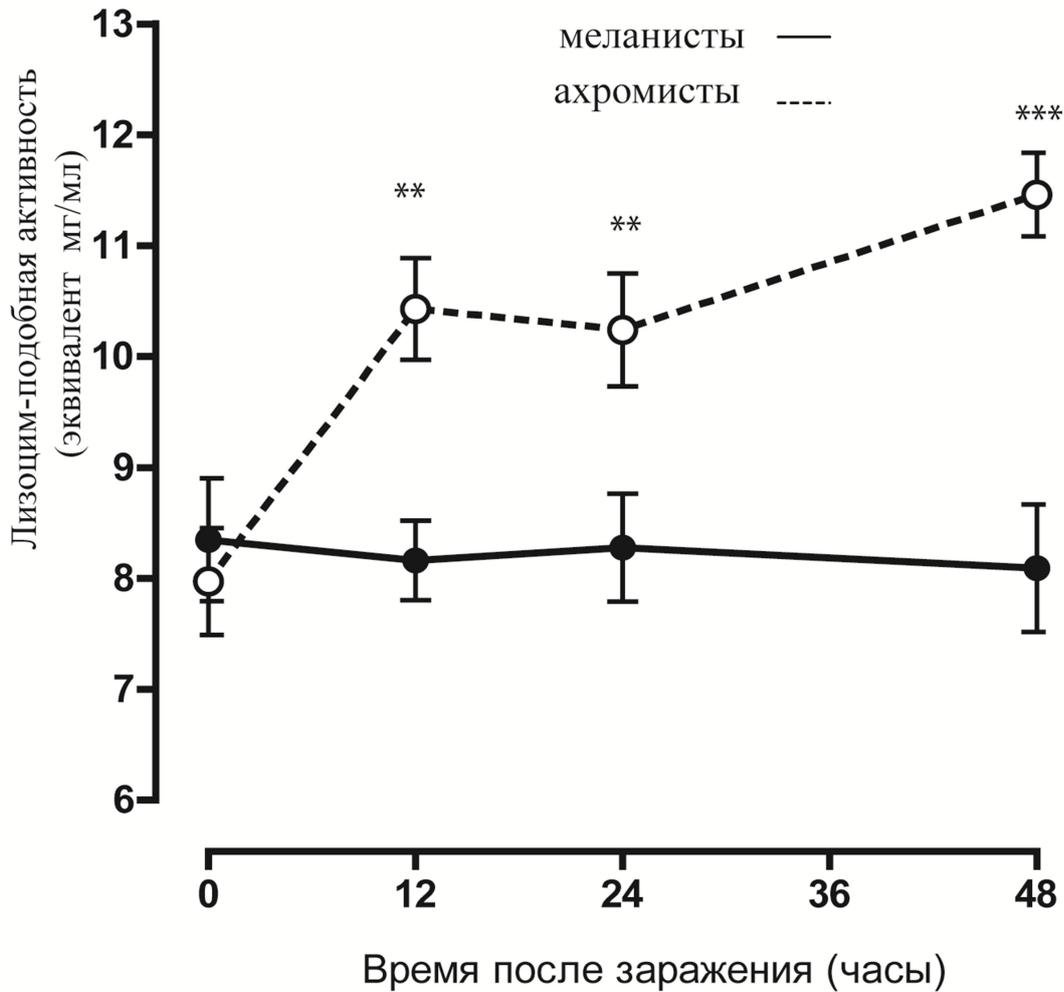


Рисунок 52. Лизоцим подобная активность в плазме гемолимфы личинок меланистической (меланисты) и светлой (ахромисты) морф вощинной огневки *G. mellonella* при заражении грибом *B. bassiana* ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ по сравнению с незараженными личинками той же морфы, $n=60$ на вариант на каждую временную точку).

Мы провели анализ экспрессии ряда генов участвующих в защитных реакциях у личинок меланистов и ахромистов при развитии микоза. В частности, был проведен анализ генов АМБ (галлериомици, галиомицин, гловерин, цекропин-Д, 6-Тох), трансферрина, который может играть как роль АМБ, так и

хелатора, ингибитора металлпоротеаз грибов (ИМРІ), белка теплового шока - БТШ 90, и контига 704 который задействован в процессах репарации тканей.

Базовый уровень экспрессии генов у меланистов и ахромистов

Анализ различий в конституциональной экспрессии данных генов у меланистов и ахромистов свидетельствует, что экспрессия ИМРІ была в 100 раз ниже у меланистов (рисунок 53). Однако базовая экспрессия АМБ генов была повышена в жировом теле личинок меланистов по сравнению с ахромистами в 6.70 ± 3.19 раз на первый и в 13.31 ± 4.72 раз на второй дни эксперимента (рисунок 53).

Уровень экспрессии генов при заражении грибом

При заражении насекомых грибом было отмечена более быстрая и выраженная активация АМБ генов у ахромистов по сравнению с меланистами (рисунок 53). В частности, 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: гловерин в 186 раз, галлериомицин в 83 раза, галиомицин в 16 раз, 6-Тох в 22 раз, цекропин-Д в 32 раза. У меланистов уровень экспрессии АМБ увеличивался в 5-15 раз для галлериомициана, галиомициана, 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 ($p < 0.05$).

Экспрессия БТШ 90 и контига 704 практически не менялась при заражении. Однако, следует отметить, что у меланистов данные гены экспрессировались более активно чем у ахромистов при заражении грибом (в 5-10 раз) (рисунок 53).

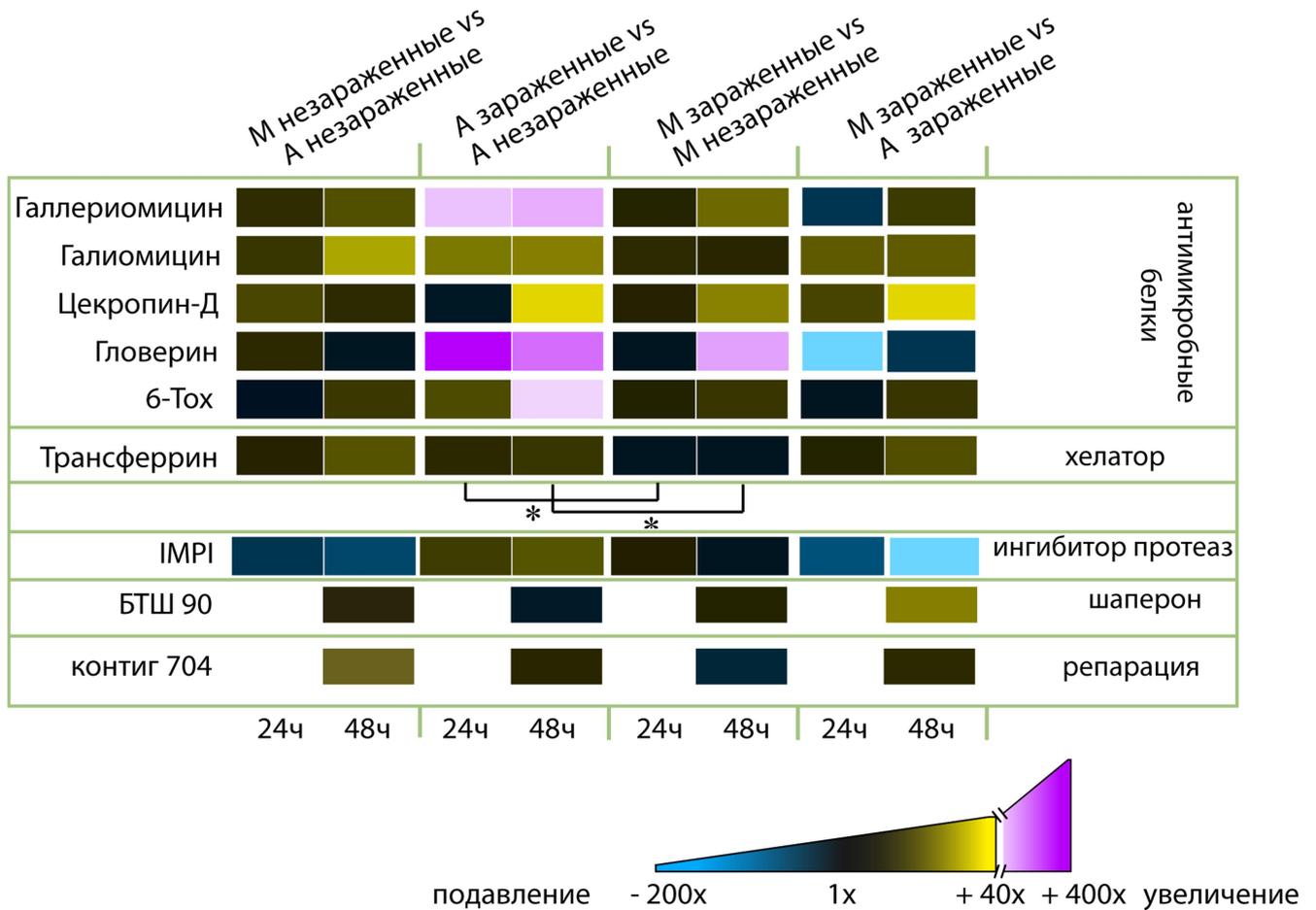


Рисунок 53. Уровень экспрессии различных генов в жировом теле личинок меланистической (меланисты, М) и светлой (ахромисты, А) морф воцинной огневки *G. mellonella* на первые и вторые сутки после заражения грибом *B. bassiana* ($p < 0.05$, $n=3$ на вариант для каждого гена) представлен как кратность изменений ($\Delta\Delta Ct$): 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 в кратности изменений в ответ на инфекцию между морфами). (* $p < 0.05$ разница для группы генов АМБ между морфами).

4.4. Морфометрические и популяционные показатели насекомых меланистической и ахромистической морф

Хотя насекомые меланистической морфы быстрее развивались до имаго (рисунок 54, А), при этом они имели пониженный (на 30 %) вес куколок ($p < 0.001$) (рисунок 54, Б) по сравнению со светлой морфой. Как следствие, плодовитость меланистов была в 2 раза меньше по сравнению с ахромистами (284.5 ± 28.5 яиц vs 588.4 ± 32.2 яиц; $p < 0.001$) (рисунок 54, В). Схожие результаты были получены на меланистах *S. littoralis* (Cotter et al., 2008)

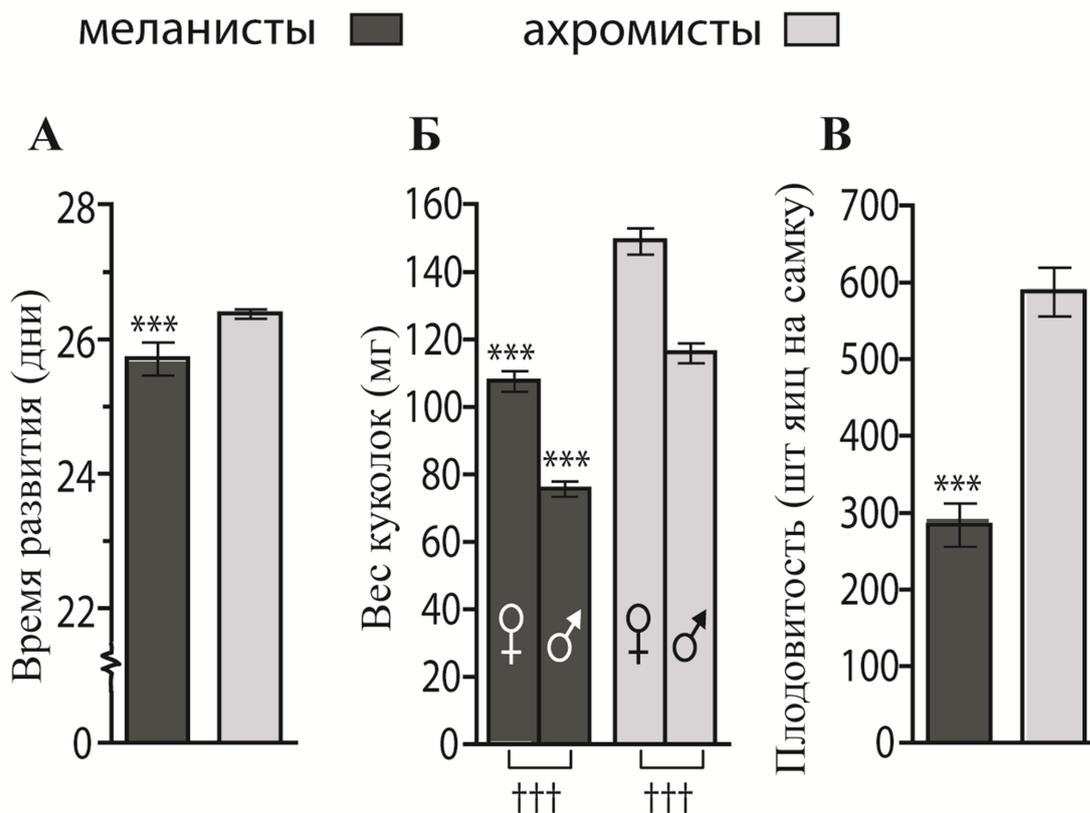


Рисунок 54. Время развития (А), вес куколок (Б) и плодовитость (В) меланистической (меланисты) и светлой (ахромисты) морф вощинной огневки *G. mellonella* (***) $p < 0.001$ по сравнению с ахромистами, ††† $p < 0.001$ по сравнению с противоположным полом той же морфы, n=100 на вариант).

Заключение к главе 4

Меланистическая морфа личинок вощинной огневки *G. mellonella* обладала повышенной резистентностью к энтомопатогенному грибу *B. bassiana*. Можно предположить, что данная резистентность будет неспецифической и будет распространяться на достаточно большую группу энтомопатогенных грибов. Это предположение основано на результатах данного исследования, а именно по изучению как морфологических структур, так и ряда физиологических систем.

Хорошо известно, что кутикула и в частности меланины могут защищать насекомых от различных грибов (St. Leger et al., 1988). В частности, при равной степени взаимодействия конидий гриба с кутикулой меланистов и ахромистов, прорастание конидий и их проникновение через кутикулу было значительно медленнее у меланистов по сравнению с ахромистами. Кроме того, кутикула меланистов была толще. Активность группы фенолоксидаз и соответственно скорость меланизации гриба была значительно выше у меланистов. Подобные морфологические и физиологические особенности меланистов приводят к задержке развития гриба в кутикуле, что позволяет личинкам избегать проникновения патогена в собственный организм. Это может быть обусловлено тем, что гриб меланизируется в кутикуле и/или не успевает проникнуть через кутикулу до линьки. С другой стороны, более длительное время проникновения гриба через кутикулу может привести к повышению активности клеточного и гуморального иммунитета в организме насекомых. Так, у меланистов уже на ранних этапах микоза происходит активация инкапсуляции и ее уровень стабильно возрастает при вялотекущем микозе. В тоже время у ахромистов, на ранних этапах уровень инкапсуляции значительно ниже, чем у меланистов, а при развитии микоза происходит ингибирование данной защитной реакции (рисунок 55). Следует отметить, что наряду с кутикулярным защитным ответом, клеточные реакции, в данном случае инкапсуляция, могут быть эффективными механизмами,

препятствующими проникновению гиф в организм насекомых. Аналогичные результаты были получены на термитах *Reticulitermes flavipes* при заражении грибами *Metarhizium anisopliae* s.l. (Chouvenc et al., 2009). У данной группы насекомых было обнаружено образование меланотического тромба в области проникновения гриба, что, по мнению авторов, способствовало предотвращению инфекции. В наших результатах, кроме высокой активности инкапсуляции, мы обнаружили высокую концентрацию гемоцитов у меланистов по сравнению с ахромистами. При этом была также отмечена их высокая реакционность, в результате чего гемоцитарный пул значительно истощался при инфекции, то есть гемоциты активно включались в реакции инкапсуляции. Ранее было установлено, что активность инкапсуляции коррелирует с количеством гемоцитов (Rowley, Ratcliffe, 1978). Мы также обнаружили, что скорость инкапсуляции коррелирует с изменением количества гемоцитов у вошинной огневки (Dubovskii et al., 2010).

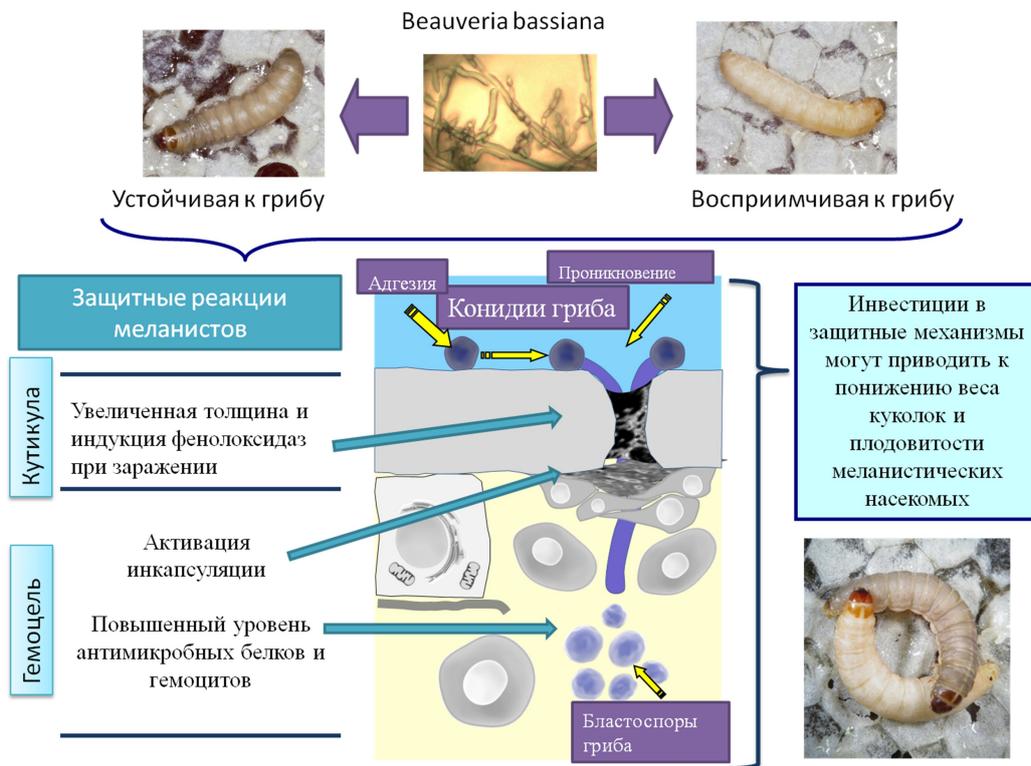


Рисунок 55. Особенности защитной стратегии (схематично) меланистической морфы вошинной огневки *G. mellonella* против энтомопатогенного гриба *B. bassiana*.

При изучении гуморального иммунитета мы обнаружили, что у меланистов повышен уровень экспрессии АМБ в жировом теле у нативных личинок. Однако, при развитии микоза уровень экспрессии значительно повышается у ахромистов. Наряду с повышением экспрессии АМБ, в гемолимфе у ахромистов мы также обнаружили увеличение активности ФО и лизоцима при микозе, при этом у меланистов эти показатели не изменялись. Это можно объяснить тем, что АМБ активно экспрессируются в ответ на различные воздействия инфекционной и не инфекционной природы, и кратность их увеличения зачастую пропорциональна силе воздействия (Mak et al., 2010). Повышенная экспрессия у ахромистов может быть связана с тем, что микоз у них происходит более активно. То есть, возможно, у меланистов ряд токсических продуктов метаболизма грибов попадает в меньшем количестве, что может определять уровень ответа АМБ. Не исключена также и ресурсная составляющая данного явления. В частности, для того чтобы поддерживать высокую экспрессию АМБ и ФО, необходимы энергетические ресурсы организма, и у меланистов они уже задействованы. Соответственно они не могут быстро мобилизовать их при внешнем воздействии (концепция trade off). Однако, при высокой активности других защитных реакций, как в кутикуле, так и в гемолимфе, для организма меланистов нет большой необходимости в данных белках.

Роль АМБ при микозах до конца не изучена. В ряде работ авторы предполагают наличие противогрибных свойств ряда АМБ, а также лизоцима (Proctor, Cunningham, 1988; Vilcinskis, Matha, 1997; During et al., 1999; Wojoda et al. 2009). Хотя для ряда АМБ были показаны антигрибные свойства (Schuhmann et al., 2003; Xu et al., 2012), в целом их активность направлена против бактерий (Wiesner, Vilcinskis, 2010). Вероятно, повышение их уровня может быть направлено на подавление сопутствующих и вторичных инфекций, особенно бактериальных (Bandani et al., 2000).

Полученные нами результаты согласуются с другими исследованиями, в которых показано усиление реакций клеточного и гуморального иммунитета у

насекомых с врожденным и плотностно-зависимым меланизмом (Wilson et al., 2001; Wilson et al., 2002; Cotter et al., 2004; Cotter et al., 2008). В частности, ранее было показано, что меланистическая форма *Spodoptera exempta* имела повышенный уровень ФО в кутикуле (Wilson et al., 2001). Коттер и др. (2004) показали, что у меланистов *Spodoptera littoralis* повышен уровень ФО и инкапсуляции в гемолимфе, но понижена антибактериальная активность. Однако, данные закономерности отмечались не во всех работах, так на меланистах *Hemideina maori* повышения иммунитета обнаружено не было (Robb et al., 2003).

Отдельно, следует отметить работы на насекомых с врожденным меланизмом. В исследованиях на большом мучном хруще *Tenebrio molitor*, селектированном по признаку кутикулярного меланизма, обнаружена повышенная ФО в гемолимфе (Armitage, Siva-Jothy, 2005). Хотя на меланистической линии *Spodoptera littoralis* обнаружено снижение данного показателя, на фоне повышенной антибактериальной активности в гемолимфе (Cotter et al., 2008). Таким образом, связь меланизма с различными физиологическими процессами и резистентностью к паразитам может зависеть от природы меланизма (плотностно-зависимый или врожденный), вида насекомого, условий эксперимента и других причин. Кроме того, практически отсутствует анализ устойчивости меланистов при заражении энтомопатогенными микроорганизмами. Это делает сравнение результатов исследований достаточно сложным, так как иммунные реакции насекомых не всегда могут предсказать уровень резистентности к энтомопатогенам.

В заключении хотелось бы отметить, что защитные механизмы меланистической морфы воцинной огневки направлены на активные стадии микоза, связанные с прорастанием через кутикулу и развитием гриба в гемоцеле. Резистентность меланистов к грибу является следствием кутикулярных и клеточных защитных реакций. Данные адаптации «энергетически затратны», и насекомые обладают существенно пониженными популяционными показателями. В целом, защитную стратегию меланистов можно обозначить как достаточно

эффективный комплекс реакций по инактивации и элиминации гриба на начальных стадиях инфекции в кутикуле. Цена резистентности для меланистов может быть полностью оправдана набором высокоэффективных защитных реакций. Тем более что адаптивная ценность механизмов резистентности меланистов может повышаться за счет устойчивости к другим энтомопатогенным микроорганизмам.

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

Существуют многочисленные исследования механизмов резистентности насекомых к паразитам, а также ключевых факторов вирулентности энтомопатогенов (Hajek, Leger, 1994; Vilcinskas et al., 1997; Bogus et al., 2007; Wojda et al., 2009 и др.). Однако основные исследования сосредоточены на отдельных защитных реакциях и отсутствует комплексный подход, позволяющий оценить общую стратегию формирования резистентности к паразитам у насекомых (Bogus et al., 2007; Wojda et al. 2009; Vilcinskas, 2010). Исследования с применением подхода по экспериментальному отбору в системах энтомопатогенный гриб-насекомое хозяин практически отсутствуют. Не охарактеризованы ключевые внутривидовые защитные стратегии насекомых, позволяющие противостоять паразиту на популяционном уровне. Как следствие, остается полностью открытым вопрос о микроэволюционных механизмах формирования устойчивости к грибам у насекомых.

Для изучения вклада иммунной системы вощинной огневки к энтомопатогенным грибам был проведен направленный отбор насекомых по принципу устойчивости к *B. bassiana*. У селектированных насекомых был изучен иммунный ответ при различных микозах в различных тканях, а также ряд морфометрических и популяционных показателей.

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 вощинной огневки была

разделена на две группы. Первую из них селектировали на устойчивость к грибу с помощью последовательного, в череде поколений, заражения (ЛК50) *B. bassiana* и отбором выживших особей (селектированная линия), вторую оставляли без селекции (контрольная линия). Повышение устойчивости к грибу отмечено у насекомых 25-го поколения (Таблица 2).

Таблица 2 Восприимчивость личинок вошинной огневки *Galleria mellonella* селектированной и контрольной линий при заражении грибом *Beauveria bassiana* (доза 7.5×10^7 конидий / мл) (n=150-196, метод Каплана Майера).

F	Линия	ЛВ25, дни	ЛВ50, дни	ЛВ75, дни	Общая смертность на, 10 день, %	n	p - между линий
5	Селектированная	6	7	8	84	153	0,229
	Контрольная	5	6	7	88	174	
10	Селектированная	5	6	9	86	187	0.333
	Контрольная	5	6	9	87	189	
20	Селектированная	6	7	8	86	150	0.143
	Контрольная	5	6	7	88	170	
25	Селектированная	5	6	8	79	196	0.010
	Контрольная	5	6	7	89	195	

При заражении насекомых селектированной (F25) и контрольной линий грибом *B. bassiana* было установлено достоверное ($p < 0.01$) увеличение устойчивости селектированных личинок по сравнению с контрольными (рисунок

56, А). Следует отметить, что отбор на устойчивость к определенному виду гриба, в данном случае к *B. bassiana*, приводил к специфической устойчивости, так как селектированная линия была восприимчива к другим видам грибов. В частности, устойчивость к энтомопатогенному грибу *M. robertsii* у насекомых селектированной и контрольной линии была одинаковой (рисунок 56, Б).

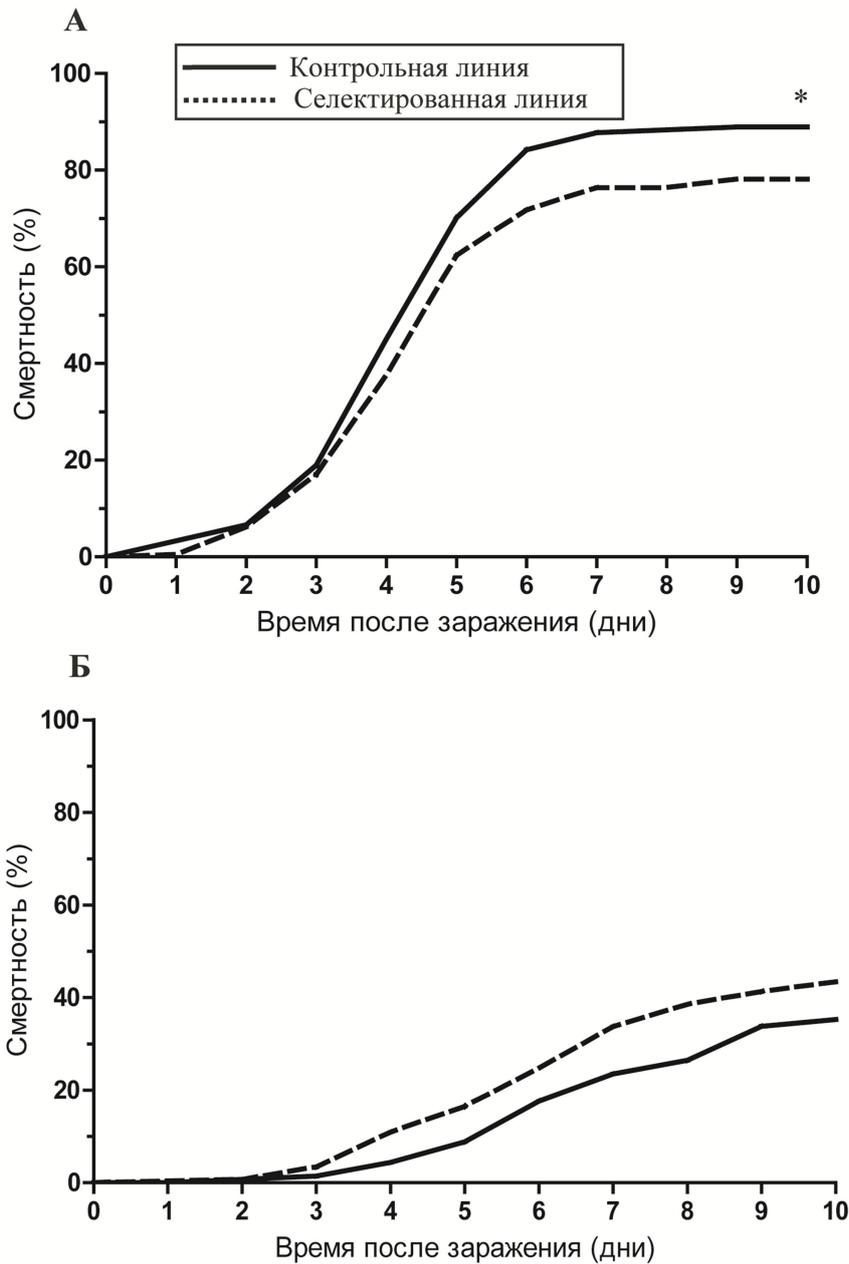


Рисунок 56. Смертность личинок селектированной (25 поколений направленного отбора по принципу устойчивости к грибу *B. bassiana*) и контрольной (не селектированной) линий воцинной огневки при заражении грибами *B. bassiana*

(А) и *M. robertsii* (Б) (* $p \leq 0.05$ по сравнению с селектированной линией, n=200 на вариант).

Для изучения роли защитных реакций при развитии устойчивости к грибу, у насекомых селектированной и контрольной линий был проведен анализ реакций клеточного и гуморального иммунитета при заражении *B. bassiana* и *M. robertsii*.

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

ФО активность в покровах

Было установлено что, уровень адгезии и активации конидий грибов на поверхности кутикулы не отличался между личинками контрольной и селектированной линий. Личинки селектированной и контрольных линий имели одинаковый конституциональный (базовый) уровень ФО активности в покровах. Однако, на ранних этапах заражения у личинок селектированной линии регистрируется повышение активности ФО в покровах как при заражении *B. bassiana*, так и *M. robertsii* по сравнению с личинками контрольной линии (рисунок 57). Следует отметить, что 24 часа после заражения соответствует этапу активного проникновения гриба через кутикулу.

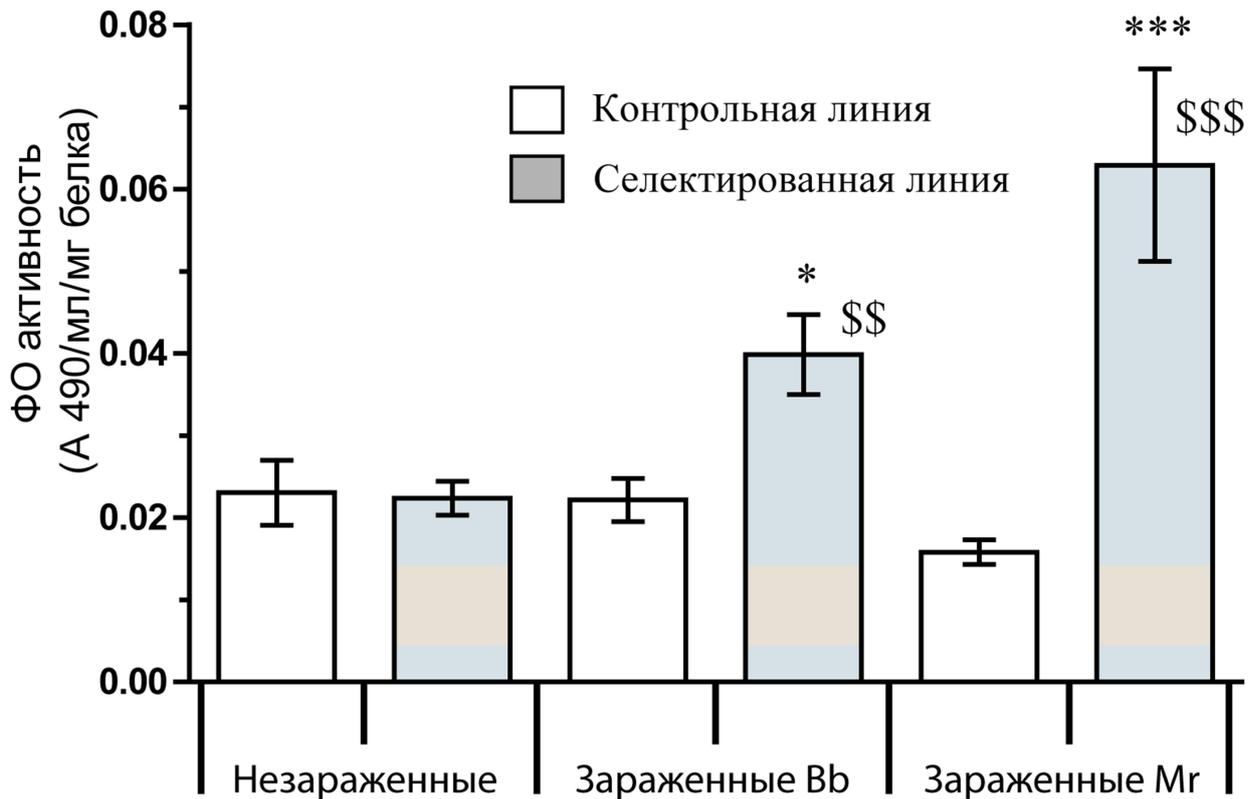


Рисунок 57. Активность фенолоксидазы (ФО) в покровах личинок селектированной (25 поколений направленного отбора по принципу устойчивости к грибу *B. bassiana*) и контрольной (не селектированной) линий воцинной огневки на первые сутки после заражения грибами *B. bassiana* (*Bb*) и *M. robertsii* (*Mr*) (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ по сравнению незараженными, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$ по сравнению с контрольной линией, $n=60$ на вариант).

Активность инкапсуляции

У личинок селектированной линии была зафиксирована повышенная базовая активность инкапсуляции в гемолимфе, по сравнению с контрольными насекомыми ($p < 0.05$) (рисунок 58). Однако, активность инкапсуляции достоверно снижалась у насекомых обеих линий при заражении грибом *B. bassiana* (рисунок 58). При этом у личинок селектированной линии подавление инкапсуляции было достоверно меньше ($p < 0.05$), чем у личинок контрольной линии (в 1.3 раза).

Заражение насекомых грибом *M. robertsii* не приводило к достоверным изменениям в активности инкапсуляции на первые сутки (рисунок 58).

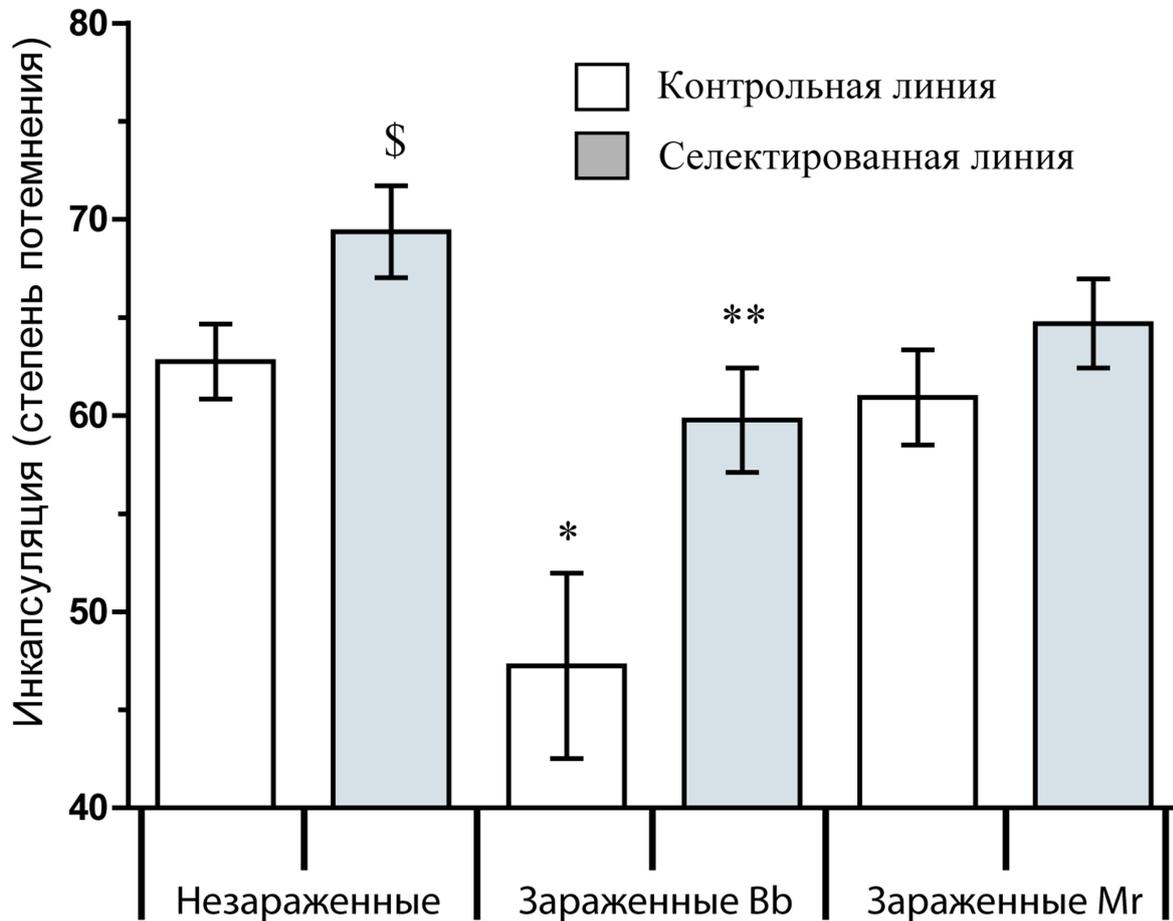


Рисунок 58. Активность инкапсуляции в гемолимфе личинок селектированной (25 поколений направленного отбора по принципу устойчивости к грибу *B. bassiana*) и контрольной (не селектированной) линий вошинной огневки на первые сутки после заражения грибами *B. bassiana* (Bb) и *M. robertsii* (Mr). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с незараженными той же линии, § $p < 0.05$ по сравнению с незараженной контрольной линией, $n = 120$ на вариант).

Лизоцим-подобная активность в гемолимфе не отличалась между личинками контрольной и селектированной линий и не изменялась при заражении (рисунок 59). ФО активность в плазме гемолимфы достоверно увеличивалась при заражении личинок контрольной линии грибом *M. robertsii*, но не *B. bassiana* (рисунок 60). ФО активность у незараженных личинок линий была одинаковой (рисунок 60).

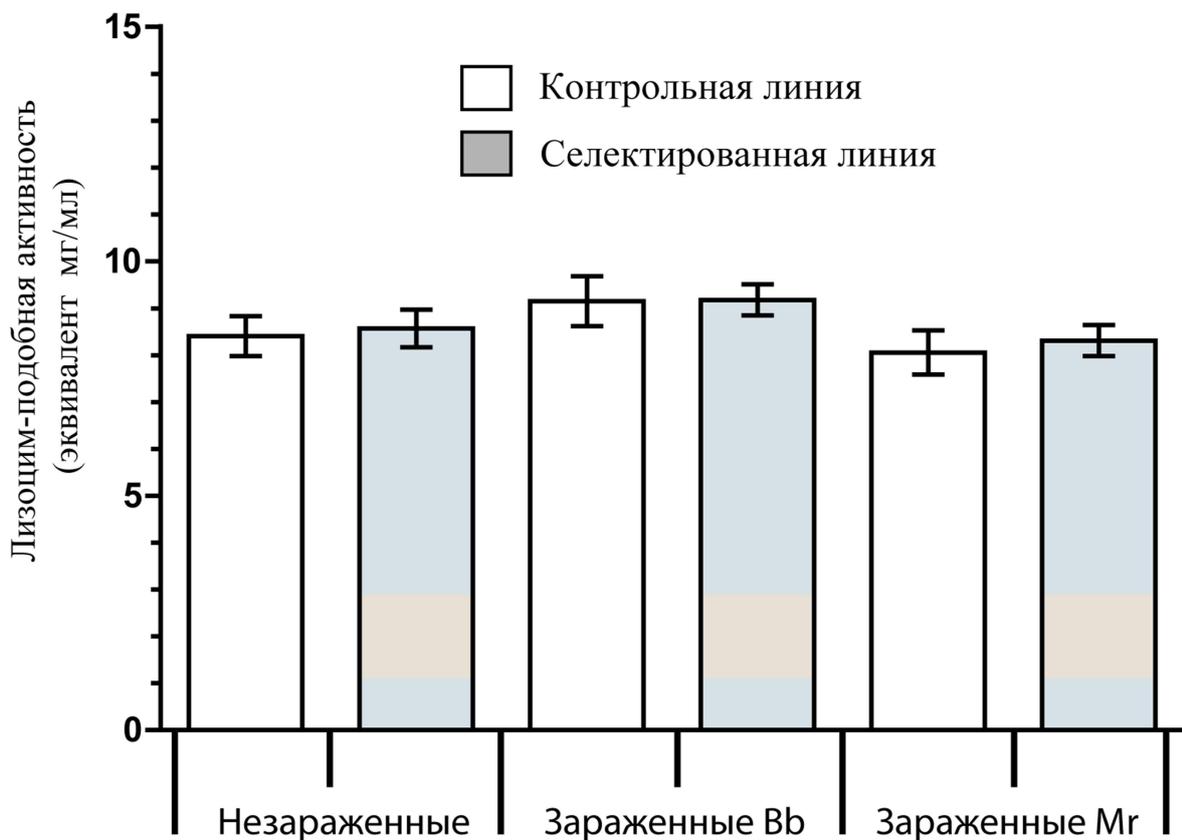


Рисунок 59. Лизоцим подобная активность в гемолимфе личинок селектированной (25 поколений направленного отбора по принципу устойчивости к грибу *B. bassiana*) и контрольной (не селектированной) линий воцинной огневки на первые сутки после заражения грибами *B. bassiana* (*Bb*) и *M. robertsii* (*Mr*) (n=60 на вариант).

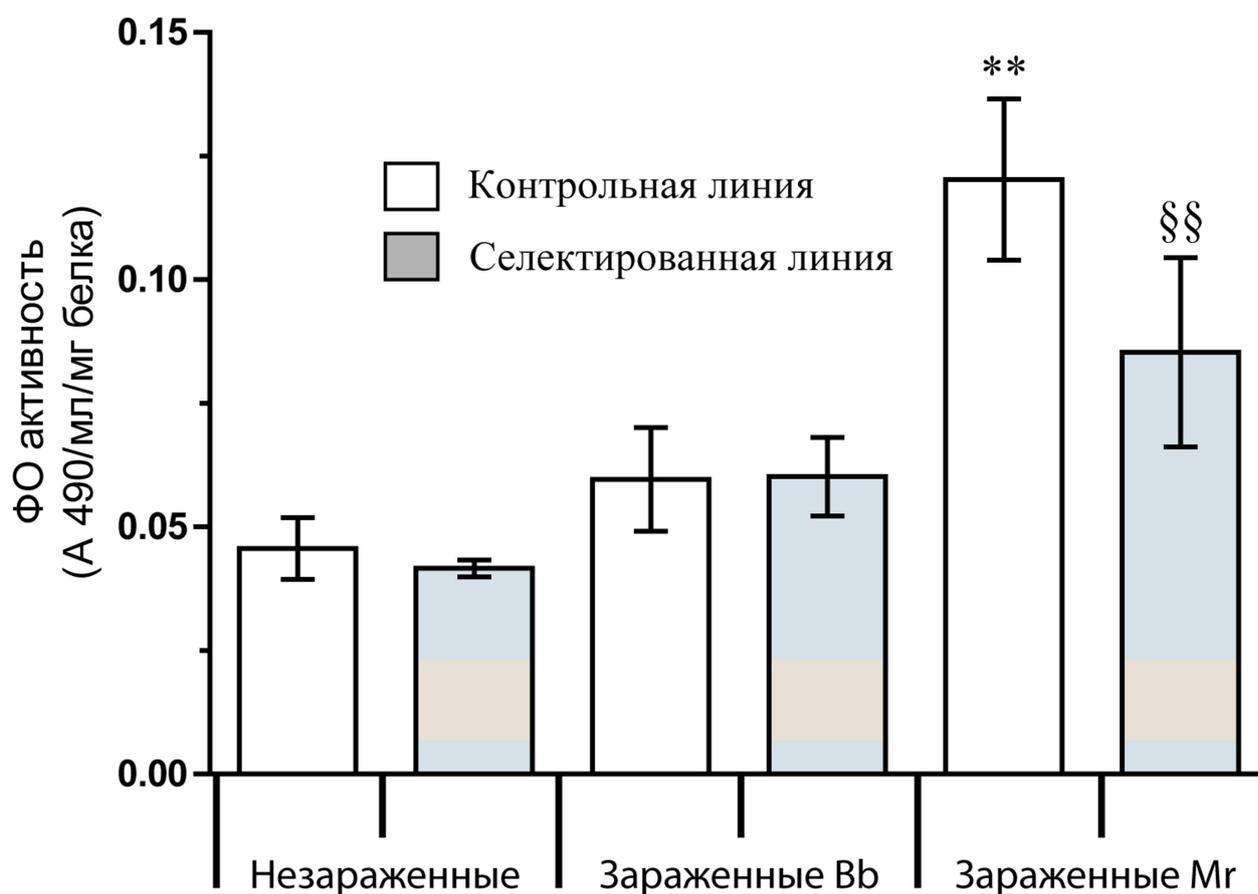


Рисунок 60. Фенолоксидазная (ФО) активность в плазме гемолимфы личинок селектированной (25 поколений направленного отбора по принципу устойчивости к грибу *B. bassiana*) и контрольной (не селектированной) линий вошинной огневки на первые сутки после заражения грибами *B. bassiana* (*Bb*) и *M. robertsii* (*Mr*). (**- $p < 0.01$ по сравнению с незараженными той же линии, §§ $p < 0.01$ по сравнению с зараженными *Mr* контрольной линии, $n = 60$ на вариант).

Уровень экспрессии IMP1

У насекомых селектированной и контрольной линии 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 (рисунок 61, А). Однако при заражении селектированных личинок грибом *B. bassiana* происходит достоверная ($p < 0.05$)

активация его экспрессии в 4-5 раз по сравнению с зараженными личинками контрольной линии (рисунок 61, А). В жировом теле зараженных насекомых мы наблюдали обратную картину. Достоверное, пятикратное увеличение экспрессии IMP1 происходило у контрольных насекомых ($p < 0.05$) (рисунок 61, Б). У насекомых зараженных грибом *M. robertsii* уровень IMP1 практически не менялся (рисунок 61, Б).

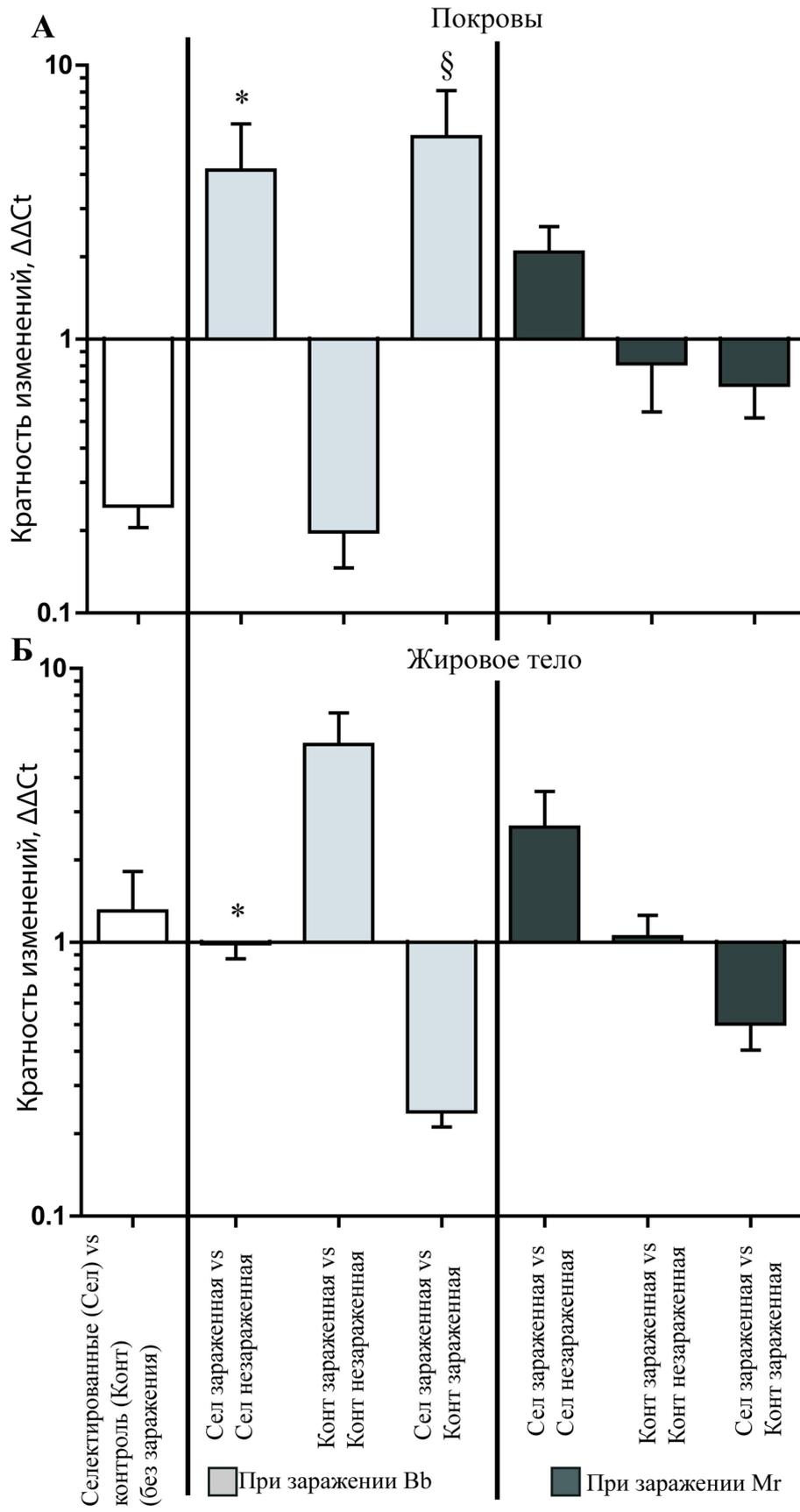


Рисунок 61. Уровень экспрессии индуцибельного ингибитора металлопротеаз (ИМПИ) в жировом теле и покровах личинок селектированной (25 поколений направленного отбора по принципу устойчивости к грибу *B. bassiana*) и контрольной (не селектированной) линий воцинной огневки на первые сутки после заражения грибами *B. bassiana* (*Bb*) и *M. robertsii* (*Mr*). Уровень экспрессии представлен как кратность изменений ($\Delta\Delta Ct$): у незараженных селектированных по сравнению с незараженными контрольными (разница в конституциональном уровне экспрессии), у зараженных личинок обеих линий по сравнению с незараженными (кратность изменения в ответ на инфекцию), у зараженных личинок селектированных по сравнению с зараженными контрольными (разница в кратности изменений в ответ на инфекцию между линиями). (* $p < 0.05$ по сравнению кратность изменений в контрольной линии при заражении *Bb*, § < 0.05 по сравнению с базовым уровнем экспрессии, $n=3$ на вариант).

Следует отметить, что ИМПИ может выступать эффективным защитным механизмом против протеаз грибов. Протеазы Pr1 грибов *Beauveria* и *Metarhizium* являются одним из важнейших факторов вирулентности (St. Leger et al., 1988; Joshi et al., 1995; Qazi, Khachatourians, 2007; Vilcinskis, 2011). Они участвуют в деградации кутикулы при прорастании гиф грибов через покровы насекомых (Hajek, Stleger, 1994; Joshi et al., 1995; Charnley, 2003; Vilcinskis, 2011). Повышенный уровень ИМПИ у личинок устойчивых насекомых при микозе вызванном *B. bassiana*, может быть специфической адаптацией к инкативации металлопротеаз данного гриба при инфекционном процессе.

Уровень экспрессии АМБ, шаперонов, поддержание окислительно-восстановительного баланса и репарация

У насекомых селектированной и контрольной линии мы провели анализ различных генов участвующих в иммунном ответе, антиоксидантной защите и регенерационных процессах. В частности, была проанализирована экспрессия генов отвечающих за синтез: АМБ (галлериомицин, галиомицин, гловерин, цекропин-Д и 6-Тох); контига - 2Gm отвечающего за передачу, связанных с иммунным ответом, сигналов в клетках (сигнальную трансдукцию); контигов репарации и регенерации (704 и 233); контигов 6GM, 15362 и 03093 связанные с регуляцией воспалительных процессов, апоптоза и сигнальной трансдукцией, контига 17373 который описан как кодирующий глутатион пероксидазу и хелатора (трансферрин). Участие белков теплового шока (БТШ) было оценено по уровню экспрессии БТШ 90 (HSP90), контига 7GM 21310 и контига 1489, отвечающих за синтез и функционирование БТШ, контига 6GM 5976, ответственного за реакции блокирующие апоптоз.

Был проанализирован конституциональный (базовый) уровень экспрессии данных генов у личинок селектированной линии по сравнению с контрольными насекомыми. Установлено, что экспрессия большинства генов была пониженной у личинок селектированной линии по сравнению с контрольной, в жировом теле (в 2-3 раза) ($p < 0.01$). В покровах экспрессия была практически одинаковой. Однако, экспрессия группы генов антиоксидантной системы (контиг 17373 – глутатион пероксидаза, контиг 03093 - пероксиредоксин), контига 704 – участвующего в репарации, 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 (рисунок 62).

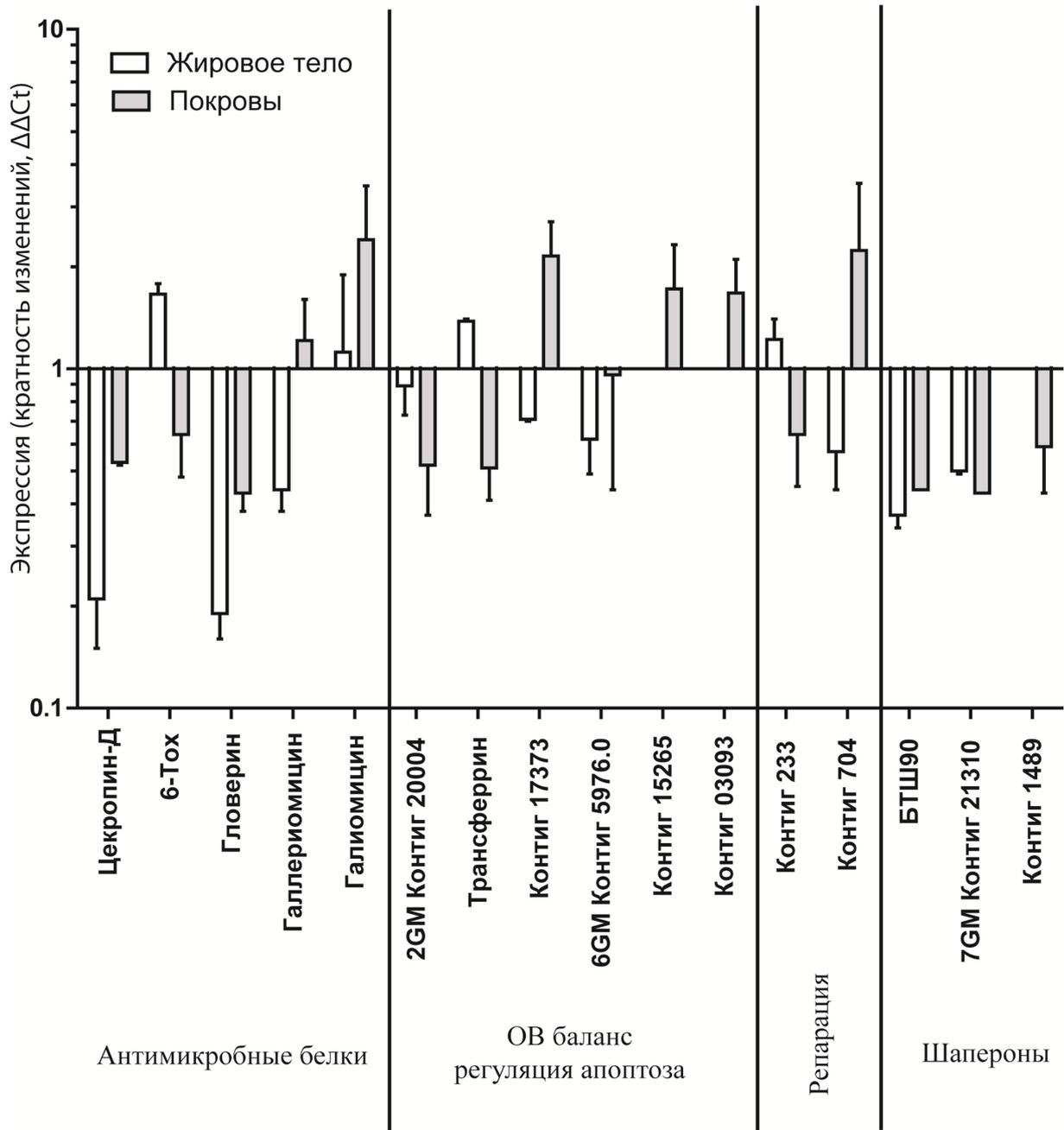


Рисунок 62. Конституциональный уровень экспрессии различных генов в жировом теле и покровах личинок селектированной (25 поколений направленного отбора по принципу устойчивости к грибу *B. bassiana*) и контрольной (не селектированной) линий воцинной огневки. Представлен как кратность изменений ($\Delta\Delta C_t$): у незараженных личинок селектированной линии по сравнению с незараженными личинками контрольной линии (разница в конституциональном уровне экспрессии, $n=3$ на вариант для каждого гена).

При заражении насекомых *B. bassiana*, активация ряда генов и их групп у селектированной линии была достоверно выше, чем у контрольных. В частности, мы обнаружили повышенный уровень экспрессии 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 63). Экспрессия контигов кодирующих антиоксидантные ферменты глутатионпероксидазу и пероксиредоксин повышалась в покровах при заражении в 2-3 раза. Регуляторы апоптоза и трансферрин при заражении селектированных насекомых были повышены в 2-3 раза, при этом их активация достоверно отличалась от зараженных личинок контрольной линии ($p < 0.05$) (рисунок 63). В целом активация группы генов АМБ была достоверно выше в покровах личинок селектированной линии при заражении *B. bassiana* по сравнению с контрольной ($p < 0.05$) (приложение 4). Отмечена интересная закономерность при анализе селекции всех генов селектированной и контрольной линии зараженных грибом. У селектированной линии происходит активация экспрессии генов в покровах, но снижение в жировом теле в ответ на заражение по сравнению с контрольной линией (приложение 4) (рисунок 63).

При инфицировании *B. bassiana*

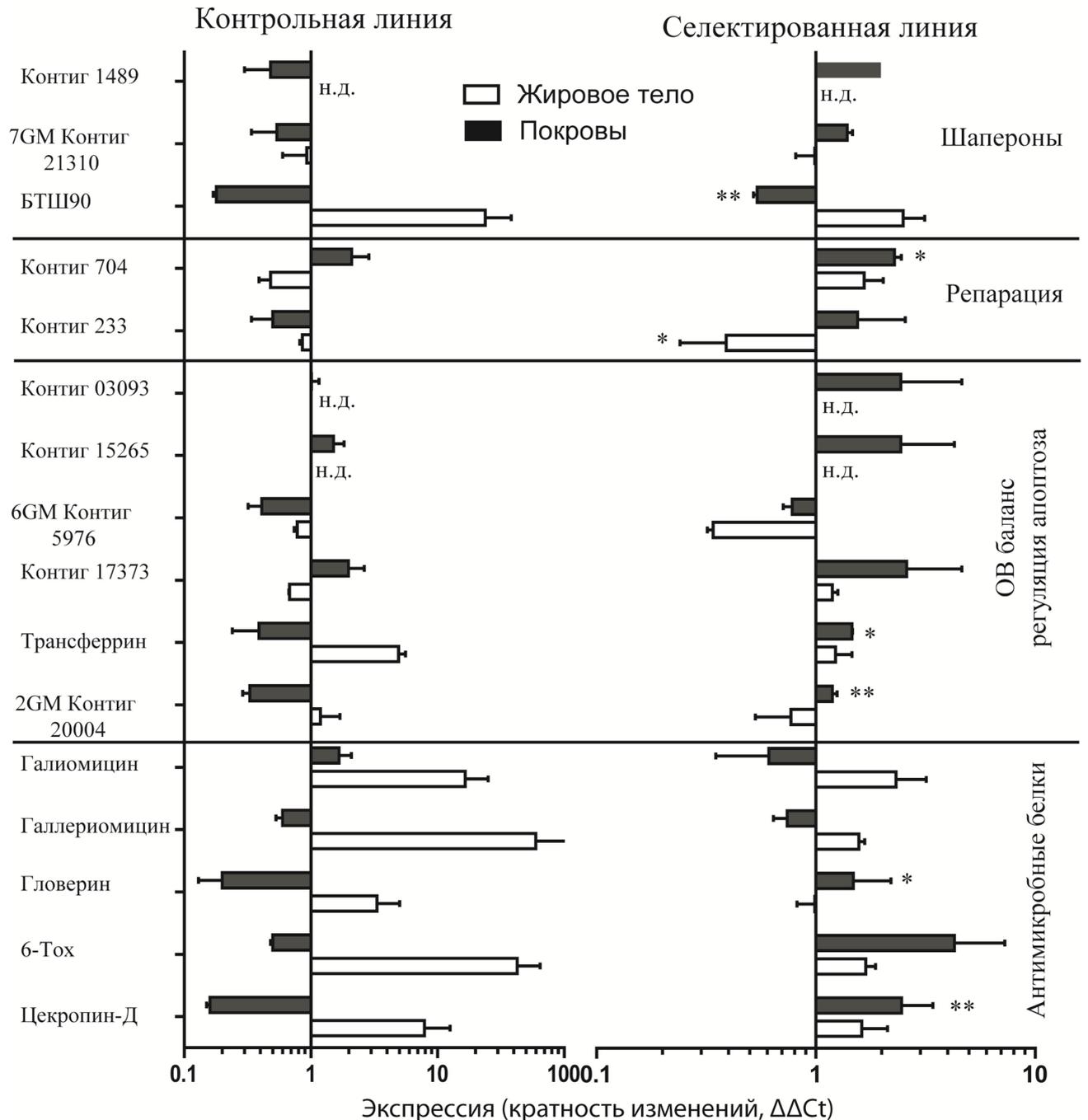


Рисунок 63. Уровень экспрессии различных генов в жировом теле и покровах личинок селектированной (25 поколений направленного отбора по принципу устойчивости к грибу *B. bassiana* (*Bb*) и контрольной (не селектированной) линий вощинной огневки на первые сутки после заражения грибами *B. bassiana* (*Bb*). Представлен как кратность изменений ($\Delta\Delta C_t$): у зараженных личинок обеих линий по сравнению с незараженными (кратность изменения в ответ на

инфекцию) ($*p < 0.05$ разница по сравнению с экспрессией гена у личинок контрольной линии, $n=3$ на вариант для каждого гена) н.д. - не детектировался.

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 ($p < 0.05$) (приложение 4) (рисунок 64). В покровах активация генов АМБ происходила у личинок контрольной линии, но не селектированной ($p < 0.05$) (приложение 4). Экспрессия галиомицина, галлериомицина и 6-Тох была достоверно ниже у зараженных *M. robertsii* селектированных насекомых. Континги 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 (рисунок 64).

При инфицировании *M. robertsii*

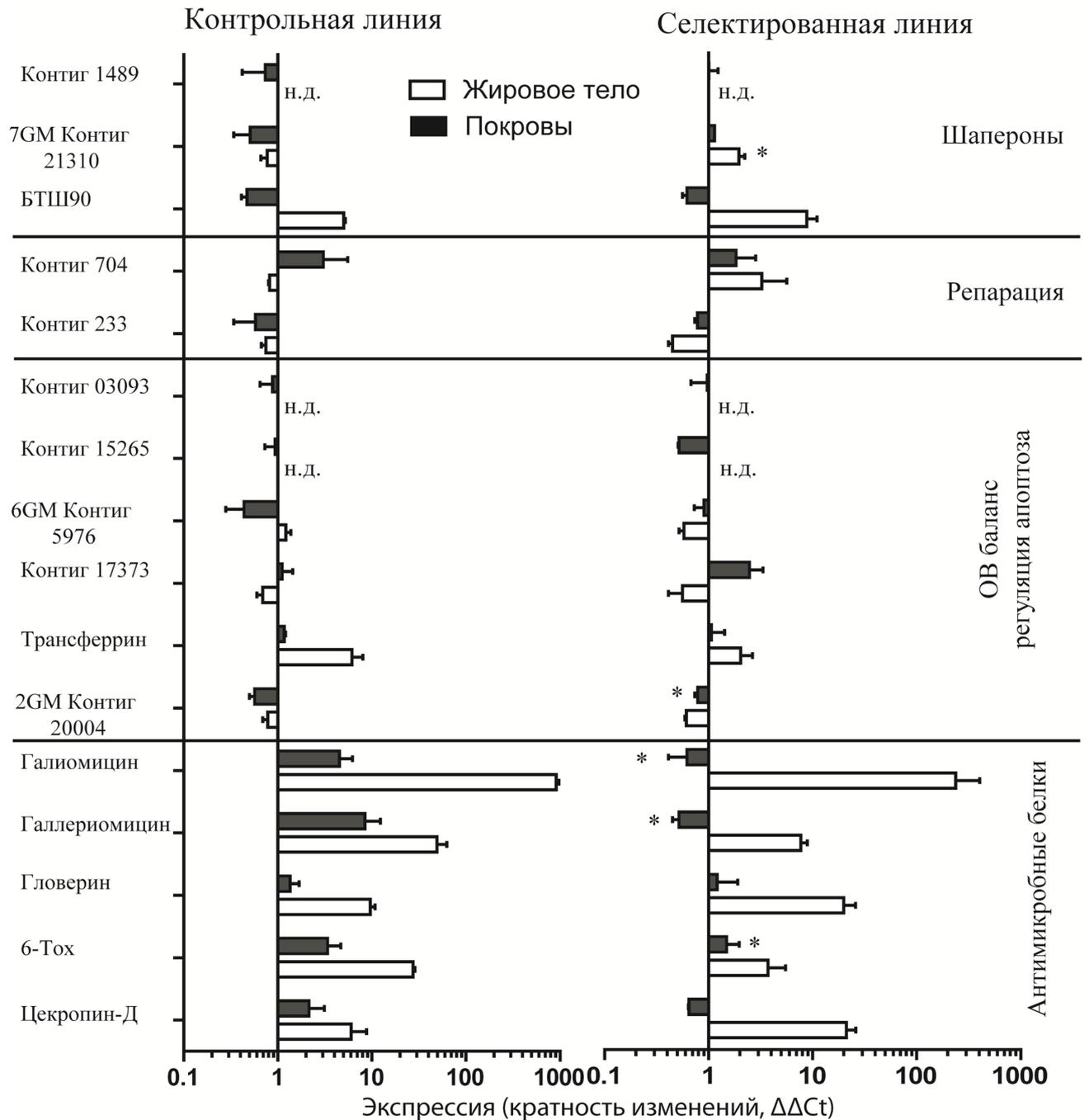


Рисунок 64. Уровень экспрессии различных генов в жировом теле и покровах личинок селектированной (25 поколений направленного отбора по принципу устойчивости к грибу *B. bassiana* (*Bb*) и контрольной (не селектированной) линий воцинной огневки на первые сутки после заражения грибами *M. robertsii* (*Mr*). Представлен как кратность изменений ($\Delta\Delta Ct$): у зараженных личинок обеих линий по сравнению с незараженными (кратность изменения в ответ на

инфекцию) (* $p < 0.05$ разница по сравнению с экспрессией гена у личинок контрольной линии, $n=3$ на вариант для каждого гена) н.д. - не детектировался.

Анализируя разницу в экспрессии генов на линиях при микозах вызванных разными грибами, можно отметить ряд особенностей. Иммунный ответ на *B. bassiana* в покровах у насекомых селектированной линии оказался более выраженным, чем на *M. robertsii* ($p < 0.05$) (приложение 5). У насекомых контрольной линии развитие гриба *M. robertsii* индуцировало экспрессию генов, как в жировом теле, так и в покровах интенсивней, чем при микозе *B. bassiana* ($p < 0.05$) (приложение 5).

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

Уровень смертности у незараженных насекомых селектированной линии была такой же, как и у контрольной. Насекомые селектированной линии с повышенной устойчивостью к *B. bassiana* не отличались по весу куколок от насекомых контрольной линии (рисунок 65, Б). Однако время их развития было больше чем у насекомых контрольной линии ($p < 0.05$) (рисунок 65, А).

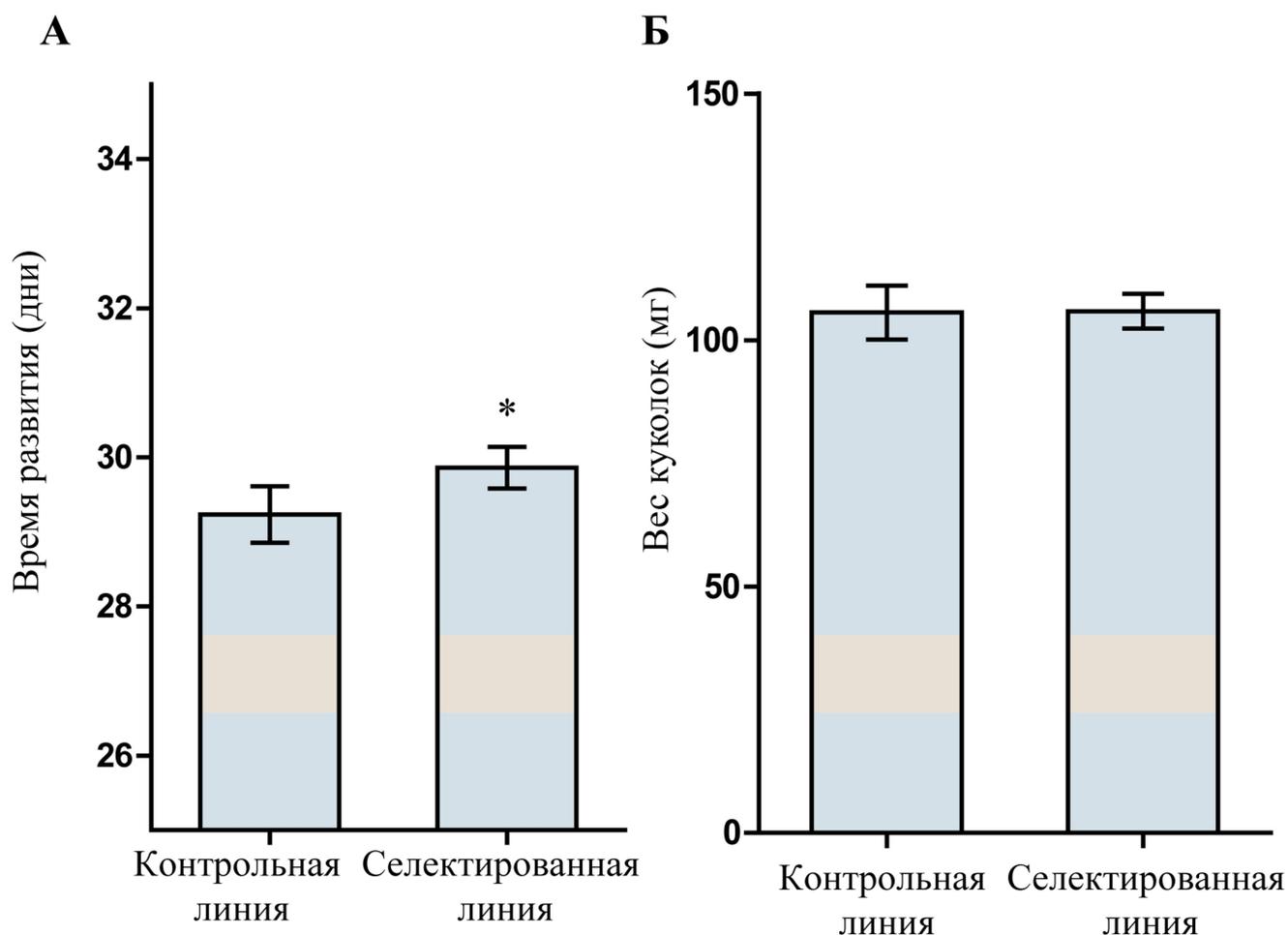


Рисунок 65. Время развития до имаго (А) и вес куколок (Б) селектированной (25 поколений направленного отбора по принципу устойчивости к грибу *B. bassiana*) и контрольной (не селектированной) линий вошинной огневки (* $p < 0.05$ по сравнению с контрольной линией, $n=90$ на вариант).

Чаще всего, у многих животных при формировании устойчивости к тем или иным патогенам происходит снижение морфологических и популяционных показателей, так называемая «цена» устойчивости (trade-off) (Gassmann et al., 2009). Однако, в нашем эксперименте мы не обнаружили изменения данных показателей у селектированной линии насекомых. Не исключено, что это связано с коротким периодом отбора на устойчивость для этого вида насекомых. Подтверждение данного предположения можно обнаружить в наших исследованиях на меланистической морфе вошинной огневки, которая обладает

повышенной устойчивостью к грибу, но при этом их плодовитость в два раза ниже. Следует отметить, что данная морфа могла формировать устойчивость более длительный период.

Заключение к главе 5

При селекции личинок по принципу устойчивости к грибу *B. bassiana* через 25 поколений происходит увеличение устойчивости насекомых к данному патогену. Устойчивость специфична к данному виду гриба. Насекомые селектированной линии не демонстрировали увеличения устойчивости к другому энтомопатогенному грибу *M. robertsii*.

Сравнительный анализ защитных реакций насекомых селектированной линии при заражении выявил ряд иммуно-физиологических адаптаций, обеспечивающих повышение специфической устойчивости к *B. bassiana*. У насекомых селектированной линии отмечено увеличение фенолоксидаз (ФО) и соответственно процесса меланизации в покровах при заражении *B. bassiana*. Заражение селектированных насекомых грибом *M. robertsii* также увеличивало активность ФО в покровах. Кроме того у селектированных насекомых был повышен базовый уровень инкапсуляции в гемолимфе, а при заражении он снижался, но меньше, чем у контрольной линии. Инкапсуляция является одним из важнейших механизмов инактивации патогенов в гемолимфе. Кроме того, процесс инкапсуляции проникающего гриба может происходить непосредственно в покровах, что приводит к задержке развития гриба или к его уничтожению (St. Leger et al., 1988). Вероятно, повышенная ФО активность и процесс инкапсуляции у селектированных насекомых играют важную роль в инактивации гриба в покровах.

Следует отметить, что процессы меланогенеза сопряжены с повышенной генерацией АКМ (Nappi, Christensen, 2005). Гены, кодирующие ряд

антиоксидантов, демонстрировали повышенный конституциональный уровень экспрессии, а также активней экспрессировались в покровах при заражении *B. bassiana*. Возможно, регуляция окислительно-восстановительного баланса у селектированной линии является одной из адаптаций, направленной на снижение деструктивных процессов при повышенной меланизации энтомопатогенов.

Помимо данных систем, насекомые селектированной линии обладали еще целым комплексом противогрибных адаптаций. Большинство из них проявлялись только при заражении грибом, что свидетельствует о важности локального ответа в месте и в момент проникновения патогена. Например, у селектированных насекомых активировалась экспрессия ингибитора металлопротеаз (IMPI) грибов. Следует отметить, что протеазы грибов являются одним из ключевых факторов вирулентности *B. bassiana* и *M. anisopliae* (St. Leger et al., 1988; Joshi et al., 1995; Charnley, 2003; Qazi, Khachatourians, 2007; Vilcinskas, 2011). Экспрессия IMPI при заражении *B. bassiana* может сдерживать развитие гриба на начальном этапе инфекционного процесса и тем более важно, чтобы этот процесс происходил непосредственно в месте, где прорастают гифальные тела грибов.

У селектированных насекомых был повышен базовый уровень экспрессии галлериомицина и галимицина в покровах. Более того, повышенный уровень их экспрессии сохранялся и при заражении *B. bassiana* (в сравнении с зараженными личинками контрольной линии). Галлериомицин и галиомицин описаны и охарактеризованы как противогрибные белки (Schuhmann et al., 2003). Они демонстрировали активность против *B. bassiana* и *M. anisopliae*. Кроме того, мы зарегистрировали, что у личинок селектированной линии в покровах происходит повышенная экспрессия нескольких АМБ: цекропина-Д, 6-Тох и гловерина. Известно, что цекропины *Drosophila* могут обладать противогрибной активностью, но против *B. bassiana* таких свойств не отмечено (Ekengren, Hultmark, 1999). Антимикробные свойства 6-Тох у вошинной огневки слабо изучены. Однако, известно, что белки близкой группы X-tox обладают опсонизирующими свойствами (Destoumieux-Garzón et al., 2009). Для гловерина

противогрибной активности не описано. Однако, он был высоко активен против различных бактерий, включая энтомопатогенные (Xu et al., 2012). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что у селектированных насекомых с повышенной устойчивостью к *B. bassiana*, АМБ активно экспрессируются в покровах на специфический антиген – гриб *B. bassiana*.

Следует отметить, что АМБ активно экспрессировались в жировом теле насекомых и при микозах *B. bassiana* и при *M. robertsii*. Пока не совсем ясно, какое значение выполняют данные АМБ при развитии грибной инфекции. Не исключено, что высокий уровень АМБ способен задержать развитие грибной инфекции. Возможно это неспецифический ответ на токсикоз насекомых. Или повышенный уровень АМБ необходим насекомым для защиты от вторичных, особенно кишечных бактериальных инфекций.

Интересные результаты были получены при анализе факторов роста и шаперонов, ответственных за процессы репарации и регенерации клеток. Базовый уровень экспрессии шаперонов был ниже у личинок селектированной линии и в покровах, и жировом теле. При заражении у обеих линий не отмечено значительного увеличения их экспрессии. Однако у личинок селектированной линии снижение для БТШ 90 в покровах было меньше. В жировом теле БТШ активно экспрессировался у обеих линий при микозах *B. bassiana* и *M. robertsii*. Роль шаперонов в ранних этапах микоза пока не ясна. Возможно, повышение экспрессии БТШ 90 в жировом теле зараженных насекомых выполняет регуляторные функции и является одним из этапов модуляции иммунной системы, но их вектор до сих пор не известен. Пониженный уровень шаперонов у селектированных насекомых также может нести регуляторное значение. Вместе с тем у личинок селектированной линии был повышен базовый уровень экспрессии одного из контигов регенерации клеток в покровах. При заражении *B. bassiana* его экспрессия была выше по сравнению с контрольной линией. Вероятно, регенерационные процессы играют важную роль при развитии патогенеза у селектированных насекомых. Своевременная замена клеток эпителия покровов

может быть необходима при их повреждении токсичными продуктами при патогенезе или непосредственно сами грибом.

Таким образом, можно сделать вывод, что у насекомых при селекции грибом *B. bassiana* происходит, в первую очередь, изменение активности защитных реакций в покровах. Это не удивительно, потому что покровы являются местом, где шансы остановить инфекцию и не допустить ее развитие в гемоцеле, достаточно высоки. Шансы насекомого на выживание при микозе увеличиваются, если грибу не удастся проникнуть за барьер, который представляет кутикула. Если гриб попадает в гемоцель, насекомым гораздо сложнее остановить инфекцию, потому что ряд адаптаций гриба (коллагеновая оболочка, токсины) препятствует развитию иммунного ответа (Vilcinskis et al., 1997; Wang, St. Leger, 2006). Отдельно стоит отметить, что данные изменения не привели к изменениям популяционных показателей. Как мы установили ранее, более высокие уровни устойчивости к грибу у меланистической морфы вощинной огневки, привели к значительному снижению плодовитости. Инвестиции в защитные реакции чаще всего достаточно затратны для насекомых (Dubovskiy et al., 2013a). Однако, эволюция резистентности – сложный и длительный процесс. Возможно, отсутствие видимых компромиссов у селектированной линии связано с ранними этапами отбора.

Различные энтомопатогенные грибы используют схожие стратегии для проникновения в организм хозяина и его колонизации. Однако, между ними существуют различия в типе используемых токсинов, а также в наборе ферментов (протеазы, липазы, хитиназы и т.д.) (Gao et al., 2011, Xiao et al., 2012; Zheng et al., 2011, 2013; Wang, St. Leger, 2014; Hu et al., 2013, 2014). Скорость роста и особенности образования бластоспор также могут существенно сказываться на инфекционном процессе (Kershaw et al., 1999; Charnley, 2003). Вполне закономерно, что при отборе насекомых на устойчивость к определенному грибу, в популяции будут закрепляться признаки позволяющие снизить активность факторов вирулентности гриба, а также предотвратить его рост. Видимо, этим

обусловлено определенной специфичностью устойчивости селектированной линии воцинной огневки к грибу *B. bassiana*. Вероятно, отличия в иммунном ответе линий на грибную инфекцию *B. bassiana* и *M. robertsii*, также связаны с различным набором факторов вирулентности данных патогенов.

Таким образом, наше исследование впервые продемонстрировало, что насекомые могут формировать устойчивость к энтомопатогенному грибу за счет многокомпонентного усиления барьерных функций покровов.

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 иммуно-физиологических 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 фенолоксидазы (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 (ИМПИ), АМБ и компонентов АО системы, которые направлены на уничтожение прорастающих гифальных тел гриба, инактивацию его ферментов и токсинов (Dubovskiy et al., 2013b).

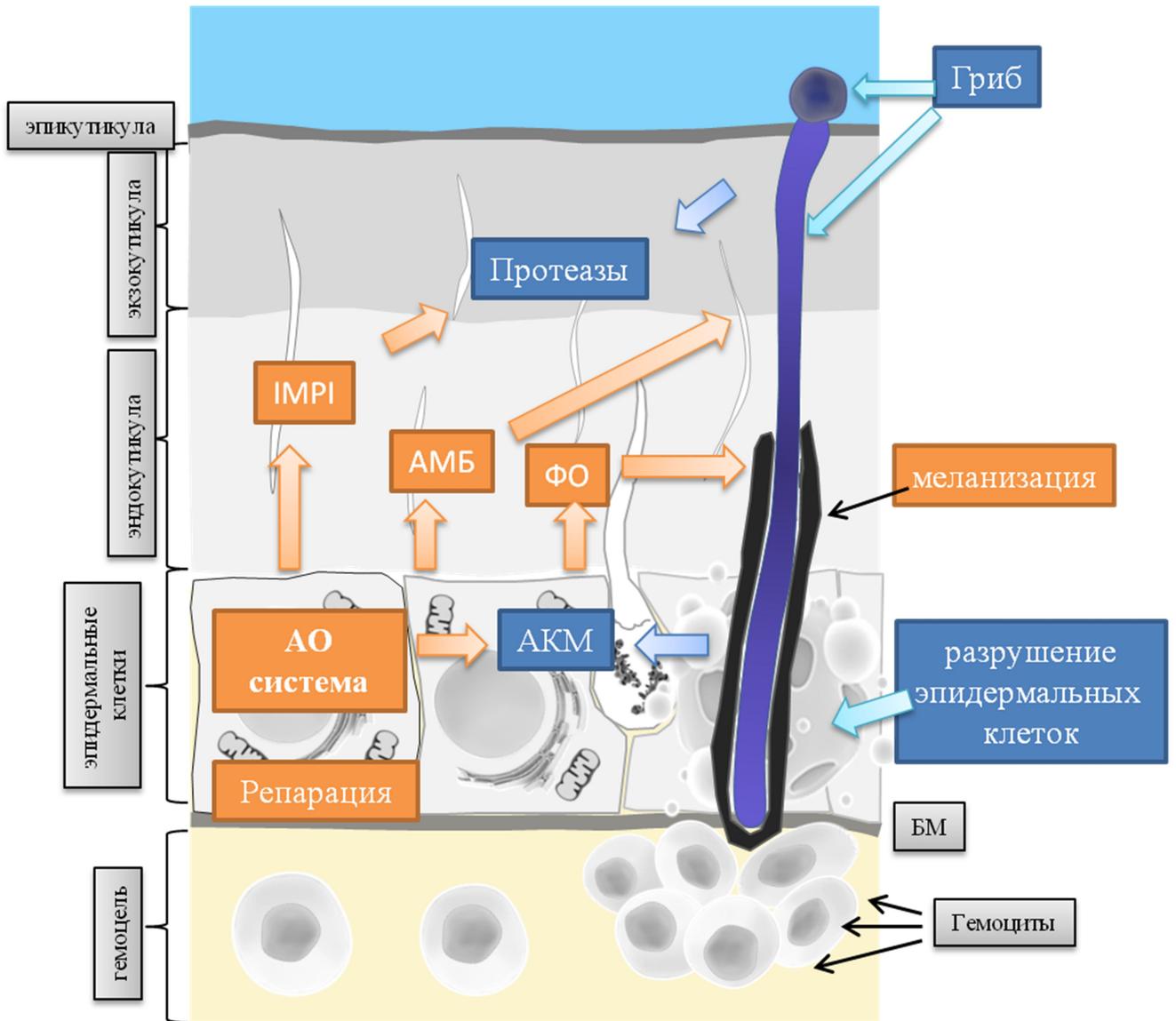


Рисунок 66. Развитие иммуно-физиологических защитных механизмов у вошинной огневки против гриба *B. bassiana* при формировании устойчивости к патогену в ходе микроэволюции.

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 66)

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 67). 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, аминопептидаз 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; Griffiths, Aroian, 2005).

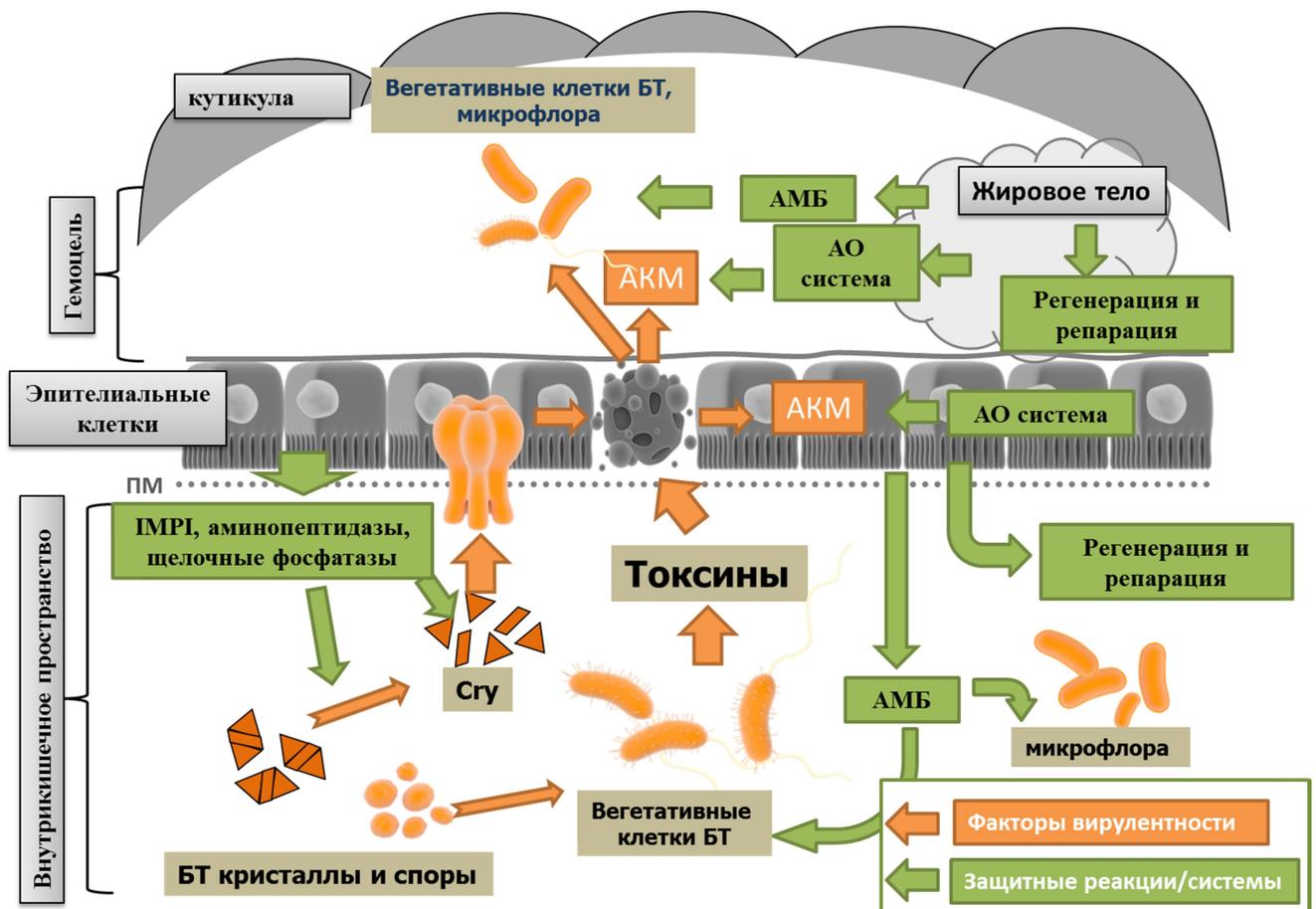


Рисунок 67. Комплекс иммуно-физиологических адаптаций при формировании резистентности вошинной огневки к бактериям БТ в ходе микроэволюции.

При незначительной инфекционной нагрузке, когда насекомые способны выжить, происходит разрушение единичных эпителиальных клеток кишечника или их определенных групп в локальных участках (Vallet-Gely et al., 2008). Соответственно, определяющими в заживлении поврежденных участков будут

регенерационные и репарационные процессы, способные предотвратить серьезные повреждения и нарушение целостности кишечника. При формировании устойчивости к БТ мы обнаружили многократное усиление регенерационных процессов в кишечнике устойчивой линии вощинной огневки.

Естественно, что любые повреждения (асептические или септические), в том числе кишечника, будут влиять на иммунную систему насекомых. Мы обнаружили, что реакции клеточного и гуморального иммунитета, локализованные в гемоцеле, принимают активное участие в защите от бактериальной инфекции (Dubovskiy et al., 2008a; Grizanova et al., 2014). Тем не менее, вклад гемоцеллюлярных защитных реакций в эволюцию резистентности к БТ представляется незначительным и нуждается в дополнительных исследованиях. Следует отметить, что системные изменения в иммунофизиологических механизмах у устойчивых к БТ линий сопровождаются значительным изменением микрофлоры кишечника. Это вполне закономерно, так как в кишечнике в первую очередь меняется экспрессия АМБ, действие которых непосредственно направлено на бактерии.

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.

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 патогенезов, 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 воцинной 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 вощинной огневки «цена» резистентности выражается в двукратном снижении плодовитости. У селективированных 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 селективированных 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 68).



Рисунок 68. 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 воцинной огневки *Galleria mellonella*, а полулетальная - 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 воцинной 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 воцинной огневки. Подавление экспрессии глутатион пероксидазы увеличивает восприимчивость насекомых к бактериальной инфекции.
4. На начальных этапах кишечного бактериоза личинок воцинной 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 Cry-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 вощинной 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 вощиной 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 СОКРАЩЕНИЙ

БТ	бактерии <i>Bacillus thuringiensis</i>
ФТМ	фенилтиомочевина
ФБ	фосфатный буфер
ПМ	перитрофическая мембрана
ИПС	искусственная питательная среда
ИМРІ	индуцибельный ингибитор металлопротеаз
ОЧГ	общее число гемоцитов
АМБ	антимикробные белки
ДОФА	дигидроксифенилаланин
АКМ	активированные кислородные метаболиты
АО	антиоксидантная
ОВ	окислительно – восстановительный
проФО	профенолоксидаза
ФО	фенолоксидаза
СОД	супероксид дисмутаза
ГСТ	глутатион-S-трансфераза
ПОЛ	перекисное окисление липидов
МДА	малоновый диальдигид
БТШ	белки теплового шока
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ЛД50	смертельная доза для 50% особей
ЛК50	смертельная для 50% особей концентрация
F	поколение
p	уровень значимости
n	объем выборки
RR	коэффициент резистентности

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акулинин, Г.Е. Экспресс – метод оценки вирулентности конидий *Beauveria bassiana* / Г.Е. Акулинин, О.А. Василенко // Микология и фитопатология. – 1993. – № 5. – С.74–76.
2. 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.
3. Андреева, И.В. Оценка боверина против вредителей защищенного грунта / И.В. Андреева, М.В. Штерншис Регуляция численности беспозвоночных и фитопатогенов. Новосибирск. – 1997. – С. 19–23.
4. Барбашова, Н.М. Антагонистические свойства и продуцирование экзотоксина *Bacillus thuringiensis* / Н.М. Барбашова, Г.А. Владимирова // Тр. ВНИИСХМ. – 1981. – Т.51. – С.151–158.
5. 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.
6. Беклемишев В. Н. Биоценологические основы сравнительной паразитологии / В. Н. Беклемишев. – М. Наука, 1970. – 502 с.
7. Борисов, Б.А. Энтомопатогенные аскомицеты и дейтеромицеты / Б.А. Борисов, В.В. Серебров, И.И. Новикова, И.В. Бойкова // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты под. ред. В.В. Глупов. - М.: Круглый год, - 2001. - С. 352–427.
8. Бурцева, Л.И. Бактериальные болезни насекомых. / Л.И. Бурцева, М.В. Штерншис, Г.В. Калмыкова // Патогены насекомых: структурные и

- функциональные аспекты под. ред. В.В. Глупов. - М.: Круглый год, - 2001. - С.189-246.
9. Вейзер, Я. Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми. / Я. Вейзер. - М.: Колос, - 1972. - 638 с.
 10. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, А.И. Деев // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – 1991.– Т. 29. – С. 1–249.
 11. Воронцова, Я.Л. Влияние микроспоридии *Vairimorpha ephestiae* (Microsporidia: Vairellidae) на активность и спектр неспецифических эстераз различных тканей личинок большой пчелиной огневки *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) / Я.Л. Воронцова, Н.И. Ершов, В.В. Глупов // Паразитология. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 74–84.
 12. Гештовт, Н.Ю. Эномопатогенные грибы (биотехнологические аспекты). / Н.Ю. Гештовт, Алматы., - 2002. - 288 с.
 13. 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 - Том 313, - № 3, - с. 297–307
 14. Глупов, В.В. Механизмы резистентности насекомых / В.В. Глупов, С.А. Бахвалов, Ю.А. Соколова, И.А. Слепнева // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты под. ред. Глупова В.В. М.: Круглый год, - 2001. - С. 475–557.
 15. Диксон, М. Ферменты. / М. Диксон, Э. Уэбб – М.: Мир, - 1982. - 1120с.
 16. Досон, Р. Справочник биохимика. / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Элиот, К.М. Джонс: - Мир, - 1991. - 350 С.
 17. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б.А. Доспехов М.: - Агропромиздат, - 1985. - 351с
 18. Дубовский И. М. Увеличение активности иммунной системы воцинной 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Евлахова, А.А. Энтомопатогенные грибы. Систематика, биология, практическое значение. / А.А. Евлахова - Л.: Наука, - 1974. - 240 с.
24. Зенков, Н.К. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б.М. Меньщикова - МАИК, - 2001. - 343 с.

25. Иванов, Г.М. Сравнение турицинов по интенсивности антагонизма в различных трофических условиях / Г.М. Иванов // Микроорганизмы в защите растений. Новосибирск. – 1981. – С.53–72.
26. Ивинскене, В.Л. Фосфолипаза и термолабильный экзотоксин *Bacillus thuringiensis* / В.Л. Ивинскене // Энтомопатогенные бактерии и их роль в защите растений: Сб. науч. тр. ВАСХНИЛ. Сиб.отд-ние. Новосибирск. – 1987. – С.57-75.
27. Кандыбин, Н.В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми. / Н.В. Кандыбин - М.: Агропромиздат, - 1989. - 175 с.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.

32. Крюков В.Ю. Перспективы применения энтомопатогенных гифомицетов (Deuteromycota, Hyphomycetes) 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. – 2007а. – Т. 6, № 2. – С. 195–204.
33. Крюков, В.Ю. Перспективы использования энтомопатогенных гифомицетов (Deuteromycota, Hyphomycetes) против колорадского жука в условиях Юго-Восточного Казахстана / В.Ю. Крюков, В.В. Серебров, А.А. Малярчук, Б.К. Копжасаров, Н.С. Мухамедиев, А.К. Орынбаева, В.П. Ходырев // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2007б. – № 4. – С. 52–60.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Лапа, Н.В. Применение боверина для защиты растений в СССР. / Н.В. Лапа, В.М. Гораль // Информационный бюллетень ВПС МОББ. – 1985. – Вып. 12. – С. 47–51.
38. Леднев, Г.Р. Динамика гибели азиатской саранчи при синхронном заражении энтомопатогенными грибами (*Metarhizium anisopliae*, *Bauveria*

- bassiana*) и бактерией *Pseudomonas* sp. / Г.Р. Леднев, В.Ю. Крюков, В.П. Ходырев, М.В. Левченко, Б.А. Дуйсембеков, О.А. Сагитов, В.В. Глупов // Сиб. экол. журн. –2007. – № 4. – С. 527–531.
39. Лескова, А.Я. Термостабильный экзотоксин *Bacillus thuringiensis* / А.Я. Лескова, Л.М. Рыбина // Энтомопатогенные бактерии и их роль в защите растений: Сб. науч. тр. / ВАСХНИЛ. Сиб. отд-ние. Новосибирск.– 1987. – С.31–42.
40. Литвинов, М.А. Методы изучения микроскопических грибов. / М.А. Литвинов.- Л.: Наука, - 1969. - 124 с.
41. Лозинская, Я.Л. Изменение активности детоксицирующих ферментов и антиоксидантного статуса личинок *Galleria mellonella* L. при микроспориidioзе. Автореф. Дис. канд.биол.наук. / Лозинская Яна Леонидовна Новосибирск, 2002. 22 с.
42. Лозинская, Я.Л. Изменение антиоксидантного статуса и системы генерации свободных радикалов в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* при микроспориidioзе / Я.Л. Лозинская, И.А. Слепнева, В.В. Храпцов, В.В. Глупов // Журнал Эволюционной Биохимии Физиологии. – 2004. – Т.2. – С. 99–103.
43. 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.
44. Мартемьянов, В.В. Реакция гусениц непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L., инфицированных вирусом ядерного полиедроза, на индуцированную резистентность березы *Betula pendula* Roth / В.В. Мартемьянов, С.А. Бахвалов, М.Дж. Рантала, И.М. Дубовский, Э.Э. Шульц, И.А. Белоусова, А.Г. Стрельников, В.В. Глупов // Экология. – 2009. – № 6. – С. 459–464.

45. Мориг, В. Значение лизоцима в антибактериальном иммунитете насекомых. / В. Мориг, Б. Месснер // Журнал общей биологии. – 1969. – Т. XXX, № 1. – С. 62–72.
46. Мюллер, Э. Микология / Э. Мюллер, В.М. Леффлер: Мир, - 1995. - 343с.
47. Огарков, Б.Н. Энтомопатогенные грибы Восточной Сибири. / Б.Н. Огарков, Г.Р. Огаркова Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та,- 2000. -134 с.
48. Огарков, Б.Н. Комплексное применение микробиологических препаратов / Б.Н. Огарков // Защита и карантин растений. – 1999. –№7. – С. 23–27.
49. Омелянчук Л.В. Регуляторный ген фенолоксидазной активности у *Drosophila melanogaster* / Л.В. Омелянчук, И.М. Дубовский, В.В. Глупов // Генетика. – 2001. – Т.37. – С.1062-1067.
50. Павлюшин, В. А. Контроль стабильности признака вирулентности у штаммов энтомопатогенных грибов / В. А. Павлюшин // Производство и применение грибных энтомопатогенных препаратов М., 1985. – С. 24–27.
51. Павлюшин, В.А. Факторы вирулентности гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. и патогенез мускардиноза насекомых // Автореф. дисс. канд. биол. наук. Л.: ВИЗР, 1979. 24 с.
52. Полтев, В.И. Микрофлора насекомых. / В.И. Полтев, И.Н. Гриценко, А.И. Егорова, Т.К. Кальвиш, Л.Л. Туркевич, Н.В.Ушакова Под ред. В.И. Полтев. Новосибирск: Наука, - 1969. - 272с.
53. Рославцева, С.А. Исследование эстеразных систем насекомых / С.А. Рославцева, О.Ю. Еремина, И.Н. Костырко // Агрехимия. – 1990. – № 10. – С. 117–123.
54. Рославцева, С.А. Эстеразы членистоногих и их роль в механизмах детоксикации инсектоакарицидов / С.А. Рославцева, Е.И. Баканова, О.Ю. Еремина // Изв. РАН. Сер. биол. – 1993. – № 3. – С. 368–375.
55. Рославцева, С.А. Современные воззрения на биохимические механизмы резистентности / С.А. Рославцева // Агрехимия. – 1994. – № 10. – С. 143–148.

56. Свистунова, О.И. Гликозилированные белки сыворотки крови: тест фруктозамин / О.И. Свистунова, В.Н. Титов // Клин. лаб.диагностика. – 1992. – №11-12. – С. 22–30.
57. Серебров, В.В. Влияние энтомопатогенных грибов на активность детоксицирующих ферментов гусениц пчелиной огневки, *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae), и роль детоксицирующих ферментов при формировании резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам / В.В. Серебров, О.Н. Гербер, А.А. Малярчук, В.В. Мартемьянов, А.А. Алексеев, В.В. Глупов // Известия РАН Серия биологическая. – 2006. – № 6. – С. 581–586.
58. Серебров, В.В. Изучение некоторых факторов синергизма между энтомопатогенными грибами и химическими инсектицидами / В.В. Серебров, А.А. Киселев, В.В. Глупов // Микология и фитопатология. – 2003. Т. 1. Вып. 37. – С. 76– 82.
59. Серебров, В.В. Изменение активности и спектра эстераз гемолимфы гусениц вошинной моли *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera; Pyralidae) при микозах / В.В. Серебров, А.А. Алексеев, В.В. Глупов // Известия РАН Серия биологическая. – 2001. – Т. 28. № 5. – С. 588–592.
60. Серебров, В.В. Перспективы совместного применения энтомопатогенных грибов и химических инсектицидов / В.В. Серебров, О.Н. Гербер, В.П. Ходырев, В.П. Цветкова // Микология и фитопатология. – 2005. – Т. 39. Вып. 3. – С.89–98.
61. Серебров, В.В. Детоксицирующие ферменты насекомых при микозах: Дис. канд. биол. наук. Новосибирск: / Серебров Валерий Владимирович ИСиЭЖ СО РАН, 2000.123 с.
62. 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.

63. Соколова, Ю.Я Подавление активности эстераз как особенность патогенеза микроспориидиоза сверчков *Gryllus bimaculatus* / Ю.Я. Соколова, О.В. Сундуков // Паразитология. – 1999. – Т. 33. Вып. 6. – С. 527–536.
64. Соколовский, В.В. Тиоловые антиоксиданты в молекулярных механизмах неспецифической реакции организма на экстремальное воздействие / В.В. Соколовский // Вопр. мед. химии. – 1988. – №6. – С. 2–11.
65. Тамарина, Н.А Техническая энтомология – новая отрасль прикладной энтомологии. Итоги науки и техники. Сер. Энтномол. / Н.А Тамарина Т. 7. Тех. Энтномол. М.: ВИНТИ, - 1987. - 247 с.
66. Тимофеев-Ресовский, Н.В. Краткий очерк теории эволюции / Н.В. Тимофеев-Ресовский, Н.Н. Воронцов, А.В. Яблоков, М. - 1977. - Наука. - 297 с.
67. Тыщенко, В.П. Физиология насекомых. / В.П. Тыщенко М.: Высшая школа, – 1986. – 303с.
68. Хвощевская М.Ф. Изменение активности супероксиддисмутазы в разных органах личинок большой вощиной 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.
69. 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.
70. Черепанов, А.И. Жуки-щелкуны Западной Сибири. / А.И. Черепанов Новосибирск: Новосиб. книжн. изд-во, – 1957. – 383 с.
71. Честухина, Г.Г Протеиназы, связанные с кристаллами *Bacillus thuringiensis* / Г.Г. Честухина, И.А. Залунин, М.П. Костина // Биохимия. – 1978. – Т.43. Вып.5. – С. 857-864.

72. Шмальгаузен И. И. Пути и закономерности эволюционного процесса. / И. И. Шмальгаузен - Избранные труды. М.: Наука, - 1983. - 360 с.
73. Штейнхаус, Э. Патология насекомых. / Э. Штейнхаус - М.: Изд-во иност.лит., - 1952. - 840 с.
74. Штерншис, М.В. Биологическая защита растений. / М.В. Штерншис, Ф.С. Джалилов, И.В. Андреева, О.Г. Томилова - М.: Колос, - 2004. - 264с.
75. Штерншис, М.В. Повышение эффективности микробиологической борьбы с вредными насекомыми. / М.В. Штерншис. - Новосибирск: Новосиб. гос. аграр. ун-т., - 1995. - 194с.
76. Штерншис, М.В. Энтомопатогены – основа биопрепаратов для контроля численности фитофагов. / М.В. Штерншис. - Новосибирск, - 2010. - 160с.
77. Штерншис, М.В. Изучение энтомопатогенного гриба *M. anisopliae* как биологического ресурса для биоконтроля насекомых-фитофагов / М.В. Штерншис, А.А. Малярчук, В.В. Гулий Вестник ТГУ. – 2008. № 313. – С. 232–236.
78. Янковский, О.Ю. Токсичность кислорода и биологические системы (Эволюционные экологические и медико – биологические аспекты) / О.Ю. Янковский. - Санкт Петербург: “Игра”, - 2000. - 294 с.
79. Agaisse, H PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. / H. Agaisse, M. Gominet, O. A. Okstad, A. B. Kolsto, D. Lereclus // Molecular Microbiology. – 1999. – 32. – P. 1043–1053.
80. Ahmad, A Effect of triol and makisterone A on the haemocytes of *Hieroglyphus nigrorepletus* Bolivar (Orthoptera: Acrididae) / A. Ahmad, M.A. Khan // Animal Science. 1988. – V. 97. № 3. – P. 203–210.
81. Ahmad, S. Adult housefly carboxylesterase: isozyme composition and tissue pattern / S. Ahmad, J.F. Larval, R.S. Pardini // Insect Biochemistry. – 1976. – V. 6. – P. 541–547.

82. Ahmad, S. Biochemical defense of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects / S. Ahmad // *Biochemical Systematics and Ecology*– 1992. – V. 20. – P.269–296.
83. Allen, R.G Oxidative influence of on development and differentiation: An overview of a free radical theory of development / R.G. Allen, A.K. Balin // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1989. – V. 6. –P. 631–661.
84. Altincicek, B Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. / Altincicek, B., S. Stotzel, M. Wygrecka, K. T. Preissner, A. Vilcinskas // *Journal of Immunology*. – 2008. – 181. – P. 2705–2712.
85. Altincicek, B Microbial metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activate innate immune responses in the lepidopteran model host *Galleria mellonella* / B. Altincicek, M. Linder, D. Linder, K. T. Preissner, A. Vilcinskas // *Infection and Immunity*. – 2007. – 75. – P. 175–183.
86. Amiri-Besheli, B. Inter- and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis / B. Amiri-Besheli, B. Khambay, S. Cameron, M.L. Deadman, T.M. Butt, // *Mycological Research*. – 2000. – V. 104. № 4. – P. 447–452.
87. Andersen, S. O. Insect cuticular sclerotization: A review. / S. O. Andersen // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2010. – 40. – P. 166–178.
88. Andrews, R.E. Protease activation of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* / R.E. Andrews, M.M. Bibilos, L.A. Bulla // *Applied and Environmental Microbiology*– 1985. – V. 50. – P. 737–742.
89. Angiuoli, S. V. CloVR: A virtual machine for automated and portable sequence analysis from the desktop using cloud computing. / S. V. Angiuoli, M. Matalka, A. Gussman, K. Galens, M. Vangala, D. R. Riley, C. Arze, J. R. White, O. White, W. F. Fricke // *BMC Bioinformatics*. - 2011. – 12.
90. Ashida, M. The prophenoloxidase activating system in crayfish. / M. Ashida, K. Soderhall // *Comparative Biochemistry and Physiology*. – 1984. –V. 77. –P 21–26.

91. Asperen, K. Study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method / K. Asperen, A. Van // *Journal of Insect Physiology*. – 1962. – V. 8. – P. 401–416.
92. Aucoin, R.R. Antioxidant enzymes as biochemical defenses against phototoxin-induced oxidative stress in three species of herbivorous lepidoptera / R.R. Aucoin, B.J.R. Philogene, J.T. Arnason // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. – 1991. – V. 16. – P. 139–152.
93. Augustyniuk–Kram, A. Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (Review) / A. Augustyniuk–Kram, K.J. Kram // *Forest ecosystems – more than just trees* Ed. J.A. Blanco. Rijeka, Shanghai: In Tech, – 2012. – P. 265–294.
94. Bandani, A. R. Production of efrapeptins by *Tolyocladium* species and evaluation of their insecticidal and antimicrobial properties / A. R. Bandani, B. P. S. Khambay, J. L. Faull, R. Newton, M. Deadman, T. M. Butt // *Mycological Research*. – 2000. – 104. – P. 537–544.
95. Bandani, A.R. The Effects of entomopathogenic fungus, *Tolyocladium cylindrosporum* on cellular defence system of *Galleria mellonella* / A.R. Bandani // *Journal of Agricultural Science and Technology*. – 2008. – V. 10. № 2. – P. 135–146.
96. Bao, Y.Y. An immune-induced Reeler protein is involved in the *Bombyx mori* melanization cascade / Y.Y. Bao, J. Xue, W.J. Wu, Y. Wang, Z.Y. Lv, C.X. Zhang // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2011. – V. 41. № 9. – P. 696–706.
97. Barnes, A. I. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity / A. I. Barnes, M. T. Siva-Jothy // *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. – 2000. – V. 267. – P. 177–182.
98. Baton, L. A. Morphological evidence for proliferative regeneration of the *Anopheles stephensi* midgut epithelium following *Plasmodium falciparum*

- ookinete invasion. / L. A. Baton, L. C. Ranford-Cartwright // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2007. – 96. – P. 244–254.
99. Beck, M.A. Dietary oxidative stress and the potentiation of viral infection / M.A. Beck, O.A. Levander // *Annual Review of Nutrition*. – 1998. – V.18. – P. 93–116.
100. Beebee, T. Differential inhibition of mammalian ribonucleic acid polymerases by an exotoxin from *Bacillus thuringiensis* / T. Beebee, A. Korner, R.P.M. Bond // *Biochemical Journal* –1972. –V. 227. –P. 619–625.
101. Bergin, D. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides / D. Bergin, L. Murphy, J. Keenan, M. Clynes, K. Kavanagh // *Microbes and Infection*. – 2006. – V. 8 (8). – P. 2105–2112.
102. Bernays, E.A. A study of tolerance of ingested tannin in *Schistocerca gregaria* / E.A. Bernays, D.J. Chamberlain // *Journal of Insect Physiology*. – 1980. – V. 26. – P. 415–420.
103. Bi, J.L. Foliar oxidative stress and insect herbivory –primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance / J.L. Bi, G.W. Felton // *Journal of Chemical Ecology*. – 1995. – V. 21. – P. 1511–1530.
104. Bidochka, M.J. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? / M.J. Bidochka, A.M. Kamp, T.M. Lavender, J. Dekoning, J.N. Amritha De Croos // *Applied and Environmental Microbiology* – 2001. – V. 67.№ 3. – P. 1335–1342.
105. Bischoff, J.F. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage / J.F. Bischoff, S.A. Rehner, R.A. Humber // *Mycologia*. – 2009. – V. 101. № 4. – P. 512–530.
106. Boctor, I.Z. Effect of *Bacillus thuringiensis* on the lipid content and compositions of *Spodoptera littoralis* larva / I.Z. Boctor, H.S. Salama // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1983. – V. 51. – P. 381–384.

107. Bogdan, C. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity / C. Bogdan, M. Rollingshoff, A. Diefenbach // *Current Opinion in Immunology*. – 2000. – V. 12, № 1. – P. 64–76.
108. Bogus, M. I. Different defense strategies of *Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella*, and *Calliphora vicina* against fungal infection. / M. I. Bogus, E. Kedra, J. Bania, M. Szczepanik, M. Czygier, P. Jablonski, A. Pasztaleniec, J. Samborski, J. Mazgajska, A. Polanowski // *Journal of Insect Physiology*. – 2007. – 53. – P. 909–922.
109. Bogus, M.I. Effects of insect cuticular fatty acids on in vitro growth and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus* / M.I. Bogus, M. Czygier, M. Golebiowski, E. Kedra, J. Kucinska, J. Mazgajska, J. Samborski, W. Wieloch, E. Wloka // *Experimental Parasitology*. – 2010. – V. 125. – P. 400–408.
110. Bohn, H. Hemolymph clotting in insects / *Immunity in invertebrates: cells, molecules, and defense reactions* // Ed. M. Brehelin. Berlin: Springer-Verlag. – 1986. – P. 188–207.
111. Boman, H.G. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae / H.G. Boman, I. Nilsson-Faye, K. Paul, T.Jr. Rasmuson // *Infection and immunity*. – 1974. – P. 136–145.
112. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding / M. M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – V. 72. – P. 248–254.
113. Bravo, A. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes / A. Bravo, H. Koen, S. Jansens // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1992. – V.60. – P. 247–253.
114. Bravo, A., Gill, S.S., Soberon, M. *Bacillus thuringiensis*: mechanisms and use. / *Comprehensive Molecular Insect Science* // Gilbert, L.I., Kostas, I., Gill, S.S. (Eds.), , vol. 6. Elsevier, Amsterdam. – 2005. – P. 175–205.

115. Brehelin, M, Zachary D. Insect haemocytes: a new classification to rule out the controversy / Immunity in invertebrates: cells, molecules, and defense reactions // Ed. Brehelin M. Berlin: Springer-Verlag, – 1986. – P. 36–48.
116. Brey, P.T.T. Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells / P.T.T. Brey, W.-J. Lee, M. Yamakawa, Y. Koizumi, S. Perrot, M. Frangois, M. Ashida // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. –1993. – V. 90. – P. 6275–6279.
117. Broderick, N. A. Recognition and response to microbial infection in *Drosophila*. / N. A. Broderick, D. P. Welchman, B. Lemaitre In: Insect infection and immunity: Evolution, Ecology, and Mechanisms, J. Rolff and S. E. Reynolds, Eds, Oxford univerrity press, – 2009. – P. 13–34.
118. Broderick, N. A. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. / N. A. Broderick, K. F. Raffa, J. Handelsman // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – 103. – P. 15196–15199.
119. Broderick, N.A. Chemical modulators of the innate immune response alter gypsy moth larval susceptibility to *Bacillus thuringiensis* / N.A. Broderick, K.F. Raffa, J.R. Handelsman // BMC Microbiology. – 2010. – V. 10. – P. 129.
120. Broderick, N.A. Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera / N.A. Broderick, C.J. Robinson, M.D. McMahon, J. Holt, J. Handelsman, K.F. Raffa // BMC Biology. – 2009. – V. 7. – P. 11.
121. Brown, A.E. Short-term starvation of immune deficient drosophila improves survival to gram-negative bacterial infections / A.E. Brown, J. Baumbach, P.E. Cook, P. Ligoxygakis // PLoS ONE. – 2009. – V. 4(2): – e4490.
122. Brown, S. E. The discovery and analysis of a diverged family of novel antifungal moricin-like peptides in the wax moth *Galleria mellonella* / S. E. Brown, A. Howard, A. B. Kasprzak, K. H. Gordon, P. D. East // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2008. – 38. – P. 201–212.

123. Brown, S.E. A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella* / S.E. Brown, A. Howard, A.B. Kasprzak, K.H. Gordon, P.D. East // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2009. – V. 39. – P. 792–800.
124. Buchon, N. *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection / N. Buchon, N. A. Broderick, T. Kuraishi, B. Lemaitre // *BMC Biology*. –2010. – 8.
125. Buchon, N. *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation / N. Buchon, N.A. Broderick, M. Poidevin, S. Pradervand, B. Lemaitre // *Cell Host & Microbe*. – 2009. – V. 5. – P. 200–211.
126. Bulet, P. Antimicrobial peptides in insects; structure and function / P. Bulet, C. Hetru, J.-L. Dimarcq, D.A. Tomann // *Developmental and Comparative Immunology*. – 1999. – V. 23. – P. 329–344
127. Burges, H.D. Teratogenicity of the thermostable beta exotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella* / H.D. Burges // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1975. – V.26. – P.419–420.
128. 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.
129. Butt, T. M., *Complementary Techniques: Fluorescence Microscopy* / *Manual of Techniques in Insect Pathology* // L. A. Lacey, (Ed.),. Academic Press, London, 1997, pp. 255-365.
130. Candas, M. Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* : alterations in the indianmeal moth larval gut proteome / M. Candas, O. Loseva, B. Oppert, P. Kosaraju, L.A. Bulla // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2003. – 2(1). – P. 19–28.

131. Caporaso, J.G. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample / J.G. Caporaso, C.L. Lauber, W.A. Walters, D. Berg-Lyons, C.A. Lozupone, P.J. Turnbaugh, N. Fierer, R. Knight // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 108(Suppl 1) – 2011 – 4516–4522.
132. Caporaso, J.G. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. / J.G. Caporaso, C.L. Lauber, W.A. Walters, D. Berg-Lyons, J. Huntley, N. Fierer, S.M. Owens, J. Betley, L. Fraser, M. Bauer, N. Gormley, J.A. Gilbert, G. Smith, R. Knight // The ISME journal – 2012 – 6, – 1621-1624.
133. Carey, M.P. Esterase activity associated with Cry1Ac-resistant *Helicoverpa zea* / M.P. Carey, B. Nolan, K. Anilkumar, W.J. Moar // International congress on invertebrate pathology and microbial control. – 2011. 07-11 August. – P. 14.
134. Carriere, Y. Effects of cotton cultivar on fitness costs associated with resistance of pink bollworm (Lepidoptera : Gelechiidae) to Bt cotton / Y. Carriere, C. Ellers-Kirk, R. Biggs, B. Degain, D. Holley, C. Yafuso, P. Evans, T. J. Dennehy, B. E. Tabashnik // Journal of Economic Entomology. – 2005. –98. – P. 947–954.
135. Carroll, J. Proteolytic processing of a coleopteran-specific δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* / J. Carroll, J. Li, D.J. Ellar // Biochemical Journal – 1989. – V. 261. – P. 99–105.
136. Castagnola, A., S. Monitoring stem cell proliferation and differentiation in primary midgut cell cultures from *Heliothis virescens* larvae using flow cytometry / A. Castagnola, S. Eda, J. L. Jurat-Fuentes // Differentiation. –2011. – 81. – P. 192–198.
137. Cavelier, F. Natural cyclopeptides as leads for novel pesticides: tentoxin and destruxin / F. Cavelier, J. Verducci, F. Andre, F. Haraux, C. Sigalat, M. Traris, A. Vey // Pesticide Science. – 1998. – V. 52. № 1. – P. 81–89.
138. Cerenius, L. The effect of the fungal toxin destruxin E on isolated crayfish haemocytes / L. Cerenius, P.-O. Trornqvist, A. Vey, M.W. Johansson, K. Soderhall // Journal of Insect Physiology. – 1990. – V. 36. № 10. – P. 785–789.

139. Cerenius, L. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates / L. Cerenius, K. Soderhall // *Immunological Reviews*. – 2004. – V. 198. № 1. – P. 116–126.
140. Cerenius, L. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity / L. Cerenius, B.L. Lee, K. Soderhall // *Trends in Immunology*. – 2008. – V. 29. No. 6. –P. 263-271.
141. Charnley, A.K. Entomopathogenic fungi and their role in pest control / A.K. Charnley, S.A. Collins, *Environmental and microbial relationships. The Mycota: A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research* // Eds. C.P. Kubicek, K. Esser and I.S. Druzhinina. V. 4. Springer, 2007. P. 159–187.
142. Charnley, A.K., Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins / A.K. Charnley // *Advances in Botanical Research*. – 2003. – V. 40. – P. 241–321.
143. Chilcott, C.N. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand / C.N. Chilcott, P.J. Wigley // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1993. –V.61. – P. 244–247.
144. Chouvenc, T. Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* / T. Chouvenc, N. Y. Su, A. Robert // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2009. – 101. – P. 234–241.
145. Cotter, S. C. Density-dependent prophylaxis and condition-dependent immune function in Lepidopteran larvae: a multivariate approach / S. C. Cotter, R. S. Hails, J. S. Cory, K. Wilson // *Journal of Animal Ecology*. – 2004. – 73. – P. 283–293.
146. Cotter, S. C. Selection for cuticular melanism reveals immune function and life-history trade-offs in *Spodoptera littoralis* / S. C. Cotter, J. P. Myatt, C. M. H. Bensch K. Wilson // *Journal of Evolutionary Biology*.– 2008. – 21. – P. 1744–1754.

147. Crickmore, N. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins / N. Crickmore, D.R. Zeigler, J. Feitelson // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 1998. – V. 62. – P. 807–813.
148. Crickmore, N. The diversity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. / N. Crickmore. – Kluwer Academic Publishers. – 2000. – P. 65–78.
149. Cross, A.R. Enzymic mechanisms of superoxide production / A.R. Cross, O.T.G. Jones // Biochimica et Biophysica Acta. 1991. – V.1057. – P. 281–298.
150. Cytrynska, M. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph / M. Cytrynska, P. Mak, A. Zdybicka-Barabas, P. Suder, T. Jakubowicz // Peptides. – 2007. – V. 28. – P. 533–546
151. Dalhammar, G. Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insect / G. Dalhammar, H. Steiner // European Journal of Biochemistry. – 1984. – V. 139. – P. 247–252.
152. Damgaard, P.H. Chapter 1.2. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment Entomopathogenic bacteria from laboratory to field application. Kluwer academic publishers. / P.H. Damgaard. - Netherlands. 2000. 510pp.
153. Damgaard, P.H. Development and application of a primerset for specific detection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil using magnetic capture-hybridisation and PCR amplification / P.H. Damgaard, C.S. Jacobsen, J. Sorensen // Systematic and Applied Microbiology. – 1996. – V.19. – P. 436–441.
154. Darboux, I. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance / I. Darboux, Y. Pauchet, C. Castella, M. H. Silva-Filha, C. Nielsen-LeRoux, J. F. Charles, D. Pauron // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2002. – 99. – P. 5830–5835.

155. de Maagd, R. A. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world / R. A. de Maagd, A. Bravo, N. Crickmore // Trends in Genetics. – 2001. – 17. – P. 193–199.
156. de Maagd, R. A. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. / R. A. de Maagd, A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore, H. E. Schnepf // Annual Review of Genetics. – 2003. – 37. – P. 409–433.
157. Dean, R.T. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation / R.T. Dean, F.U. Shanlin, R. Stocker, M.J. Davies // Biochemical Journal. – 1997. – V. 324. – P. 1–18.
158. Destoumieux-Garzón, D. *Spodoptera frugiperda* X-Tox protein, an immune related defensin rosary, has lost the function of ancestral defensins. / D. Destoumieux-Garzón, M. Brehelin, P. Bulet, Y. Boublik, P.-A. Girard, S. Baghdiguian, R. Zumbihl, J.-M. Escoubas // PLoS ONE. – 2009. – 4. – e6795.
159. Donovan, W.P. Cloning of the *nprA* gene for neutral protease A of *Bacillus thuringiensis* and effect of in vivo deletion of *nprA* on insecticidal crystal protein / W.P. Donovan, Y. Tan, A.C. Slaney // Applied and Environmental Microbiology. – 1997. – V. 63. – P. 2311–2317.
160. Drapier, J.C. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron sulphur enzymes in the macrophage effector / J.C. Drapier, J.B. Hibbs // The Journal of Immunology. – 1988. – V. 140. – P. 2829–2838.
161. Dubois, T. Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis* / T. Dubois, K. Faegri, S. Perchat, C. Lemy, C. Buisson, C. Nielsen-LeRoux, M. Gohar, P. Jacques, N. Ramarao, A. B. Kolsto, D. Lereclus // PLOS Pathogens. – 2012. – 8.
162. Dubovskiy I.M. Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi? / I. M. Dubovskiy, M. A. Whitten, O.N. Yaroslavtseva, C. Greig, V.Y. Kryukov, E.V. Grizanova, K. Mukherjee, A. Vilcinskas, V.V. Glupov, T.M. Butt // PLoS ONE. – 2013b. – 8(4). – e60248.

163. Dubovskiy, I. M. More than a colour change: insect melanism, disease resistance and fecundity / I. M. Dubovskiy, M. A. Whitten, V. Y. Kryukov, O. N. Yaroslavtseva, E. V. Grizanova, C. Greig, K. Mukherjee, A. Vilcinskas, P. V. Mitkovets, V. V. Glupov, T. M. Butt // *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences.* – 2013a. – 280.
164. 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.* – 2008a. – V. 98/3. – P. 360–362.
165. 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.
166. 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, V.V. Martemyanov, Y.L. Vorontsova, M.J. Rantala, E.V. Gryzanova, V.V. Glupov // *Comparative Biochemistry and Physiology.* – 2008b. – V. 148. P. 1–5.
167. 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. – P. 92–96.
168. Dushay, M. S., Insect hemolymph clotting. Cellular and Molecular Life / M. S. Dushay // *Sciences.* – 2009. – 66. – P. 2643–2650.
169. Edlund, T. Evidence for two immune inhibitors from *Bacillus thuringiensis* interfering with the humoral defense system of saturniid pupae / T. Edlund, I. Siden, H.G. Boman // *Infection and Immunity.* – 1976. – V. 14. – P. 934–941.

170. Ekengren, S. *Drosophila* cecropin as an antifungal agent / S. Ekengren, D. Hultmark, // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. –1999. – 29. – P. 965–972.
171. Eleftherianos, I. Prior infection of *Manduca sexta* with non-pathogenic *Escherichia coli* elicits immunity to pathogenic *Photobacterium luminescens*: Roles of immune-related proteins shown by RNA interference / I. Eleftherianos // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2006. – V. 36. – P. 517–525.
172. Ericsson, J.D. Is decreased generalized immunity a cost of Bt resistance in cabbage loopers *Trichoplusia ni*? / J.D. Ericsson, A.F. Janmaat, C. Lowenberger, J. H. Myers // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2009. –V. 100. № 2. – P. 61–67.
173. Estruch, J. J. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects / J. J. Estruch, G. W. Warren, M. A. Mullins, G. J. Nye, J. A. Craig, M. G. Koziel // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1996. – 93. – P. 5389–5394.
174. Fan, Y. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase / Y. Fan, W. Fang, S. Guo, X. Pei, Y. Zhang, Y. Xiao, D. Li, K. Jin , M.J. Bidochka , Y. Pei // *Applied and Environmental Microbiology* – 2007. – V. 73. № 1. – P. 295–302.
175. Faust, R.M. Bacterial and their toxins as insecticides. / R.M. Faust, A.L. Bulla, E. Kurstaki // *In Microbial and Viral Pesticides Ed.*; Marcel Dekker Inc.: Nova York, NY, USA, 1982.
176. Fedhila, S. The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route / S. Fedhila, P. Nel, D. Lereclus // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – 184. – P. 3296–3304.
177. Feeny, P.P. Plant apparency and chemical defense / J. Wallace and R. L. Mansell (eds.). // *Biochemical Interactions Between Plants and Insects. Recent Advances in Phytochemistry*. – 1976. – V.10. Plenum Press, New York. - pp. 1–40

178. Felton, G.W., Gatehouse J.A. Antinutritive plant defence mechanisms in Lehane / G.W. Felton, J.A. Gatehouse // *Biology of the insect midgut* Chapman&Hall. 1996. P. 486.
179. Fenoglio, C. Cytochemical characterization of the hemocytes of *Leucophaea maderae* (Dictyoptera: Blaberoidea) / C. Fenoglio, P. Bernardini, M. V. Gervaso // *Journal of Morphology*. – 1993. – V. 218. № 2. – P. 115–126.
180. Ferre, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* / J. Ferre, J. Van Rie // *Annual Review of Entomology*. – 2002. – 47. – P. 501–533.
181. Flanders, S.E. Manipulated bacterial epizootics in *Anagasta* populations / S.E. Flanders, I.M. Hall // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1956. – V. 7. – P. 368–377.
182. Forcada, C. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins / C. Forcada, E. Alcacer, M.D. Garcera, R. Martinez // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. – 1996. – V. 31. – P. 257–272.
183. Forcada, C. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: proteolytic and SEM study of the larval midgut / C. Forcada, E. Alcacer, M.D. Garcera, A. Tato, R. Martinez // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. – 1999. – V. 42. – P. 51–63.
184. Frankenhuyzen, K. Interactions between *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and midgut bacteria in larvae of gypsy moth and spruce budworm / K. Frankenhuyzen // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2010. – V. 103. – P. 124–131.
185. Fujimoto, K. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A1 of *Drosophila melanogaster* / K. Fujimoto, N. Okino, S.-I. Kawabata, S. Iwanaga, E. Ohnishi // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1995. – V. 92. – P. 7769–7773.
186. Gahan, L. J. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. / L. J. Gahan, F. Gould, D. G. Heckel // *Science*. – 2001. – 293. – P. 857–860.

187. Gandhe, A.S. Novel immune up-regulated protein mediates nodulation response in insects / A.S. Gandhe, S.H. John, J. Nagaraju, A. Noduler // *Journal of Immunology*. – 2007. – V. 179. – P. 6943–6951.
188. Gao, Q. A. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum* / Q. A. Gao, K. Jin, S. H. Ying, Y. J. Zhang, G. H. Xiao, Y. F. Shang, Z. B. Duan, X. A. Hu, X. Q. Xie, G. Zhou, G. X. Peng, Z. B. Luo, W. Huang, B. Wang, W. G. Fang, S. B. Wang, Y. Zhong, L. J. Ma, R. J. St Leger, G. P. Zhao, Y. Pei, M. G. Feng, Y. X. Xia, C. S. Wang // *PLOS Genetics*. – 2011. – 7.
189. Gardiner, E.M.M. Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth *Pseudoplusia includens* / E.M.M. Gardiner, M.R. Strand // *Journal of Insect Physiology*. – 1999. – V. 45. № 2. – P. 113–126.
190. Gassmann, A. J. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* / A. J. Gassmann, Y. Carriere, B. E. Tabashnik // *Annual Review of Entomology*. – 2009. – 54. – P. 147–163.
191. Gatehouse, J.A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction / J.A. Gatehouse // *New Phytologist*. – 2002. – V.156. – P. 145–169.
192. Gazit, E. The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore / E. Gazit, P. La Rocca, M. Sansoni, Y. Shai // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1998. – V.95. – P. 12289–12294.
193. Gilby, A. R., Chemical methods (lipids). / A. R. Gilby // *Cuticle techniques in arthropods*. T. A. Miller, (Ed.), Springer-Verlag, New York, 1980, pp. 217-252.
194. Gill, S.S. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins / S.S. Gill, E.A. Cowles, P.V. Pietrantonio // *Annual Review of Entomology*. – 1992. – V. 37. – P. 661–636.
195. Gillespie, J.P. Biological mediators of insect immunity / J.P. Gillespie, M.R. Kanost // *Annual Review of Entomology*. – 1997. – V. 42. – P. 611–643.

196. Gillespie, J.P. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria* / J.P. Gillespie, R. Bateman, A.K. Charnley // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1998. – V. 71. № 2. – P. 128–137.
197. Gillespie, J.P. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum* / J.P. Gillespie, C. Burnett, A.K. Charnley // *Journal of Insect Physiology*. – 2000. – V. 46. – P. 429–437.
198. 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.
199. 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.
200. Goettel, M.S. Pathogenesis of the hyphomycete *Tolypocladium cylindrosporum* in the mosquito *Aedes aegypti* / M.S. Goettel // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1988. – V. 51. № 3. –P. 259–274.
201. Gonzalez-Cabrera, J. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) / Gonzalez- J. Cabrera, B. Escriche, B.E. Tabashnik, J. Ferre // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2003. – V. 33. – P. 929–935.
202. Gottar, M. dual detection of fungal infections in drosophila via recognition of glucans and sensing of virulence factors / M. Gottar, V. Gobert, A. A. Matskevich, J.-M. Reichhart, C. Wang, T. M. Butt, M. Belvin, J. A. Hoffmann, D. Ferrandon // *Cell*. – 2006. – 127. – P. 1425–1437.
203. Gould, F. effects of *Bacillus-thuringiensis* and hd-73 delta-endotoxin on growth, behavior, and fitness of susceptible and toxin-adapted strains of *Heliothis-*

- virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). / F. Gould, A. Anderson, // Environmental Entomology. – 1991. – 20. – P. 30–38.
204. Gregorio, E.D. An immune-responsive serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila* / E.D. Gregorio, S.-J. Han, W.-J. Lee, M.-J. Baek, T. Osaki, S.-I. Kawabata, B.-L. Lee, S. Iwanaga, B. Lemaitre, P.T. Brey // Developmental Cell. – 2002. – V. 3. № 4. – P. 581–592.
205. Griffiths, J. S. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins / J. S. Griffiths, R.V. Aroian // BioEssays. – 2005. – V. 27. – P. 614–624.
206. 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.
207. Gullan, P.J. The insects: an outline of entomology. / P.J. Gullan, P.S. Cranston Oxford: Wiley-Blackwell, – 2010. – 567 p.
208. Gunnarsson, S.G.S. Effects *in vivo* of β -1,3-glucans from fungal cell walls on the circulating haemocytes of the desert locust *Schistocerca gregaria* / S.G.S. Gunnarsson // Journal of Insect Physiology. – 1988. –V. 34. № 1. – P. 47–51.
209. Gunning, R.V. New Resistance Mechanism in *Helicoverpa armigera* Threatens Transgenic Crops Expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin / R.V. Gunning, H.T. Dang, F.C. Kemp, I.C. Nicholson, G.D. Moores // Applied and Environmental Microbiology –2005. – Vol. 71. No. 5. – P. 2558–2563.
210. Gupta, A. P Immunology of Invertebrates: Cellular / Encyclopedia Of Life Sciences. Nature Publishing Group, 2001. P. 1–6.
211. Gupta, A.P. Cellular elements in the hemolymph. / A.P. Gupta // Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology. V. 3. eds. Kerkut G.A., Gilbert L.I. Oxford: Pergamon, – 1985 – P. 401–451.
212. Gupta, A.P. Insect immunocytes and other hemocytes: roles in cellular and humoral immunity. / A.P. Gupta // Immunology of Insects and Other Arthropods ed. Gupta A.P. CRC Press, 1991. P. 19–118.

213. Habig, W.H. Glutathione-S-transferases / W.H. Habig , M.J. Pabst , W.B. Jakoby // The Journal of Biological Chemistry. – 1974. – V. 249. – P. 7130–7139.
214. Haine, E.R. Functional consequences of blood clotting in insects / E.R. Haine, J. Rolff, M.T. Siva-Jothy // Developmental and Comparative Immunology. – 2007. – V. 31. – P. 456–464.
215. Hajek, A.E. Interactions between fungal pathogens and insect hosts / A.E. Hajek , R.J. St. Leger // Annual Review of Entomology. – 1994. – V. 39. – P. 293–322.
216. Hall, M. Proenzyme of *Manduca sexta* phenoloxidase: Purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning / M. Hall, T. Scott, M. Sugumaran, K. Soderhall, J.H. La // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1995. – V. 92. – P. 7764–7768.
217. Hancock, R. E. W. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies / R. E. W. Hancock, H.-G. Sahl // Nature Biotechnology. – 2006. – V. 24. № 12. – P. 1551–1557.
218. Harding, C. R. Use of *Galleria mellonella* as a Model Organism to Study *Legionella pneumophila* Infection. / C. R. Harding, G. N. Schroeder, J. W. Collins, G. Frankel // Jove-Journal of Visualized Experiments. – 2013. – 22(81). – e50964.
219. Hassan, A. E. M. Ultrastructural-study of the penetration by *Metarhizium anisopliae* through dimilin-affected cuticle of *Manduca sexta* / A. E. M. Hassan, A. K. Charnley // Journal of Invertebrate Pathology. – 1989. – 54. – P. 117–124.
220. Heckel, D.G. The complex genetic basis of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in insects / D.G. Heckel // Biocontrol Science and Technology. – 1994. – V. 4. – P. 405–417.
221. Herbert, D.A . Bioassay of a beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis* against *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae) / D.A. Herbert, J.D. Harper // Journal of Economic Entomology. – 1986. – V.79. – P.592–595.
222. Hernandez, S. Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) hemocytes / S. Hernandez, H. Lanz,

- M. H. Rodriguez, J.A. Torres, A. Martinez-Palomo, V. Tsutsumi // *Journal of Medical Entomology*. 1999. – V. 36. № 4. – P. 426–434.
223. Hernández-Martínez, P. Increase in midgut microbiota load induces an apparent immune priming and increases tolerance to *Bacillus thuringiensis* / P. Hernández-Martínez, B. Naseri, G. Navarro-Cerrillo, B. Escriche, J. Ferré, S. Herrero // *Environmental Microbiology*. –2010. – V. 12(10). – P. 2730–2737.
224. Herrero, S. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. / S. Herrero, T. Gechev, P. L. Bakker, W. J. Moar, R. A. de Maagd // *BMC Genomics*. – 2005. – 6. – 96.
225. Hirayama, K. Effect of oxidative stress on interorgan metabolism of glutathione / K. Hirayama, A. Yasutake, M. Inoue // *Med.Biochem.Chem.Asp.FreeRad.* – 1989. —P.559–562.
226. Hodgman, T. C. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins determined by compilational analysis / T. C. Hodgman, D.J. Ellar // *DNA Seq.* – 1990. – V. 1(2). – P. 97–106.
227. Hoffman, M.E. Correlation between cytotoxic effect of hydrogen peroxide and the yield of DNA strand breaks in cells of different species / M.E. Hoffman, A.C. Mello-Filho, R. Meneghini // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1984. – V.781. – P. 234– 238.
228. Hoffmann, J.A. Innate immunity of insects / J.A. Hoffmann // *Current Opinion in Immunology.* – 1995. – V. 7. № 1 – P. 4–10.
229. Hopkins, T.L. Insect cuticle sclerotization / T.L. Hopkins, K.J. Kramer // *Annual Review of Entomology.* – 1992. – V. 37. – P. 273–302.
230. Hu, Q.B. Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10 / Q.B. Hu, S.X. Ren, J.H. Wu, J.M. Chang, P.D. Musa // *Toxicon.* – 2006. – V. 48. № 5. – P. 491–498
231. Hu, X. Genome survey uncovers the secrets of sex and lifestyle in caterpillar fungus / X. Hu, Y. Zhang, G. Xiao, P. Zheng, Y. Xia, X. Zhang, R.J. St Leger, X.

- Liu, Ch. Wang // Chinese Science Bulletin. – 2013. – V. 58. № 23. – P. 2846–2854.
232. Hu, X. Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation / X. Hu, G. Xiao, P. Zheng, Y. Shang, Y. Su, X. Zhang, X. Liu, S. Zhan, R. J. St. Leger, Ch. Wang // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2014. – 1412662111. – P. 1–6.
233. Humber, R.A. Fungi: Identification / R.A. Humber // Manual of techniques in insect pathology Ed. Lacey L.A. Academic Press, – 1997 – P. 153–185.
234. Hung, S.Y. Phenoloxidase activity in hemolymph of naive and *Beauveria bassiana*-infected *Spodoptera exigua* Larvae / S.Y. Hung, D.G. Boucias // Journal of Invertebrate Pathology. – 1996. – V. 67. № 1. – P. 35–40.
235. Huxham, I. M. Inhibitory effects of cyclodepsipeptides, Destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae*, on cellular immunity in insects / I. M. Huxham, A. M. Lackie, N.J. J. McCorkindale // Journal of Insect Physiology. – 1989a. – V. 35. № 2. – P. 97–105.
236. Huxham, I.M. In vivo and in vitro assays for pathogenicity of wild-type and mutant strains of *Metarhizium anisopliae* for three insect species / I.M. Huxham, K.D.Z. Samuels, J.B. Heale, N.J. McCorkindale // Journal of Invertebrate Pathology. – 1989b. – V. 53. – № 2. P. 143–151.
237. Hwang, J. RNA interference of an antimicrobial peptide, gloverin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, enhances susceptibility to *Bacillus thuringiensis* / J. Hwang, Y. Kim // Journal of Invertebrate Pathology. – 2011. – V. 108. – P. 194–200.
238. Ignoffo, C.M. Effects of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin on larval maturation, adult longevity, fecundity, and egg viability in several species of Lepidoptera / C.M. Ignoffo, B. Gregory // Environmental Entomology. – 1972. – V.1. – P. 269–272.
239. Ikezawa, H. Complete purification of phosphatidylinositol-specific Phospholipase-C from a strain of *Bacillus thuringiensis*. / H. Ikezawa, T.

- Nakabayashi, K. Suzuki, M. Nakajima, T. Taguchi, R. Taguchi // *Journal of Biochemistry*. – 1983. – 93. – P. 1717–1719.
240. Inglis, G.D. Grasshoppers and locusts. / G.D. Inglis, M.S. Goettel, M.A. Erlandson, D.K. Weaver // *Field manual of techniques in invertebrate pathology. Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests* eds. Lacey L.A., Kaya H.K. Springer, – 2007. – P. 627–654.
241. Iwanaga, S. Clotting cascade in the immuno response of horseshoe crab; Phylogenetic perspectives / S. Iwanaga, S. Kawabata, Y. Miura, N. Seki, T. Shigenaga, T. Muta // *Immunity: The Insect Host Defense* eds. Hoffmann J., Natori S. USA: Biomedical Publishers, – 1994. – P. 79–96.
242. James, P.J. Inhibition of desert locust (*Schistocerca gregaria*) malpighian tubule fluid secretion by destruxins, cyclic peptide toxins from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* / P.J. James, M.J. Kershaw, S.E. Reynolds, A.K. Charnley // *Journal of Insect Physiology*. – 1993. – V. 39. № 9. – P. 797–804.
243. James, R. R. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. / R. R. James, J. Xu // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2012. – 109. – P. 175–182.
244. James, R.R. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* / R.R. James, J.S. Buckner, T.P. Freeman // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2003. – V. 84. № 2. – P. 67–74.
245. Jamieson, D. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals / D. Jamieson // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1989. – V. 7(1). – P. 87-108.
246. Jarrold, S. L. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. / S. L. Jarrold, , D. Moore, U. Potter, A. K. Charnley // *Mycological Research*. – 2007. – 111. – P. 240–249.
247. Jiang, H. Immunity in Lepidopteran Insects. / H. Jiang, A. Vilcinskas, M. R. Kanost // *Invertebrate Immunity*. – 2010. – 708. – P. 181–204.

248. Jiang, H.B. Characterization and functional analysis of 12 naturally occurring reactive site variants of serpin-1 from *Manduca sexta* / H.B. Jiang, M.R. Kanost // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – V. 272. № 2. – P. 1082–1087.
249. Johnston, P. R. Gut bacteria are not required for the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* toward the tobacco hornworm, *Manduca sexta* / P. R. Johnston, N. Crickmore // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2009. – 75(15): P. – 5094-5099.
250. Jones, S.L. Phagocytosis *Fundamental Immunology* / S.L. Jones, F.P. Lindberg, E.J. Brown ed. Paul WE., Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999. 997–1020.
251. Joshi, L. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. / L. Joshi, R. J. St. Leger, M. J. Bidochka // *FEMS Microbiology Letters*. – 1995. – 125. – P. 211–217.
252. Joshi, P.A. The ultrastructure of hemocytes in *Dactylopius confusus* (Cockerell), and the role of granulocytes in the synthesis of cochineal dye / P.A. Joshi, P.L. Lambdin // *Protoplasma*. – 1996. – V. 192. – P. 199–216.
253. Jurat-Fuentes, J. L. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. / J. L. Jurat-Fuentes, M. J. Adang // *European Journal of Biochemistry*. – 2004. – 271. – P. 3127–3135.
254. Jurat-Fuentes, J.L. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae / J.L. Jurat-Fuentes, M.J. Adang // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2006. – V. 92(3). – P. 166–171.
255. 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):1453-64.
256. Kanost, M.R. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta* / M.R. Kanost, H. Jiang, X.-Q. Yu // *Immunological Reviews*. – 2004. – V. 198. – P. 97–105.

257. Kershaw, M. J. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect / M. J. Kershaw , E. R. Moorhouse , R. Bateman , S. E. Reynolds , A. K. Charnley // Journal of Invertebrate Pathology. – 1999. – Vol. 74. № 3. – P. 213–223.
258. Khachatourians, G.G. Entomopathogenic fungi: biochemistry and molecular biology / G.G. Khachatourians, S.S. Qazi // Human and Animal Relationships The Mycota V. 6. P. 1. Eds. Brakhage A.A., Zipfel P.F. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008 – P. 33–61.
259. Khramtsov, V. Quantitative determination of SH groups in low and high molecular weight compounds by an EPR method / V. Khramtsov, V. Yelinova, L. Weiner, T. Berezina, V. Martin, L. Volodarsky // Analytical Biochemistry. – 1989. – V. 182. – P. 58–63.
260. Khramtsov, V.V. Quantitative determination and reversible modification of thiols using imidazolidine biradical disulfide labl / V.V. Khramtsov, V.I. Yelinova, Yu.I. Glazachev, V.A. Reznikov, G. Zimmer, L. Weiner, T. Berezina, V. Martin, L. Volodarsky // Journal of Biochemical and Biophysical Methods. –1997. – V.35 – P. 115–128.
261. Kim, T. Overview of innate immunity in *Drosophila*. Review / T. Kim, Y.-J. Kim // Journal of biochemistry and molecular biology. –2005. –V. 38. № 2. – P. 121–127.
262. Klowden, M.J. Physiological systems in insects. / M.J. Klowden. - USA: Elsevier, 2007. 688 p.
263. Knowles, B.H. Colloid-osmotic lysis in general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins with different insect specificity / B.H. Knowles, D.J. Ellar // Biochimica et Biophysica Acta. – 1987. – V. 924. – P. 509–518.
264. 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. – 35. – P. 495–501.
265. Kono, Y. Superoxide radical inhibits catalase. Plants / Y. Kono, I. Fridovich // The Journal of Biological Chemistry. – 1982. – 257. – P. 5751–5753.
266. Kramer, K.J. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides / K.J. Kramer, S. Muthukrishnan // Insect Biochemistry and Molecular Biology – 1997. – V.27. – P. 887–900.
267. Kramer, K.J. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems / K.J. Kramer, M.R. Kanost, T.L. Hopkins, H. Jiang, Y.C. Zhu, R. Xu, J.L. Kerwin, F. Turecek // Tetrahedron. – 2001. – V. 57. № 2. – P. 385–392
268. Krieg, A. Concerning alpha-exotoxin produced by vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. / A. Krieg // Journal of Invertebrate Pathology. – 1971. – 1. – P. 134–135.
269. Kruidenier, L. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease — radicals or ridiculous? / L. Kruidenier, H.W. Verspaget // Alimentary Pharmacology & Therapeutics. – 1997. – V. 16. – P. 2015.
270. Kryukov, V.Yu. Synergistic action of entomopathogenic Hyphomycetes and the bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* in the infection of colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* / V.Yu. Kryukov, V.P. Khodyrev, O.N. Yaroslavtseva, A.S. Kamenova, B.A. Duisembekov, V.V. Glupov // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2009. – V. 45. № 5. – P. 511–516.
271. Kryukova, N.A. The effect of *Habrobracon hebetor* venom on the activity of the prophenoloxidase system, the generation of reactive oxygen species and encapsulation in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae / N.A. Kryukova, I.M. Dubovskiy, E.A. Chertkova, Y.L. Vorontsova, I.A. Slepneva, V.V. Glupov // Journal of Insect Physiology. – 2011. – V. 57. № 6. – P. 796–800.
272. Kunimi, Y. Relationship of larval phase and susceptibility of the armyworm, *Pseudaletia separata* Walker (Lepidoptera, Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis

- virus and a granulosis virus / Y. Kunimi, E. Yamada // *Applied Entomology and Zoology*. – 1990. – V. 25. – P. 289–297.
273. Kwon, S. Immunosuppressive action of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, enhances pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* against diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Yponoineutidae) / S. Kwon, Y. Kim // *Biological Control*. – 2007. – V. 42. – P. 72–76.
274. Lavine, M.D. Insect hemocytes and their role in immunity / M.D. Lavine, M.R. Strand // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2002. – V. 32. – P. 1295–1309.
275. Leal, S.C.M. Amplification and restriction endonuclease digestion of the Pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains / S.C.M. Leal, D.J. Bertioli, T.M. Butt, J.H. Carder, P.R. Burrows, J.F. Peberdy // *Mycological Research*. – 1997. – V. 101. № 3. – P. 257–265.
276. Lebestky, T. Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors / T. Lebestky, T. Chang, V. Hartenstein, U. Banerjee // *Science*. – 2000. – V. 288, № 5463. – P. 146–149.
277. Lee, J.H. *Galleria mellonella* 6-Tox Gene, Putative Immune Related Molecule in Lepidoptera / J.H. Lee, S. Park, K.S. Chae, I.H. Lee // *International Journal of Industrial Entomology*. – 2010. – Vol. 21, No. 1. – P. 127–132.
278. Lee, K. P. Flexible diet choice offsets protein costs of pathogen resistance in a caterpillar / K. P. Lee, J.S. Cory, K. Wilson, D. Raubenheimer, S.J. Simpson // *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. – 2006. – V. 273. – P. 823–829.
279. Lee, M.K. Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration / M.K. Lee, F. Rajamohan, F. Gould, D.H. Dean // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1995. – V. 61. – P. 3836–3842.
280. Lee, Y.S. Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella* / Y.S. Lee, E.K. Yun, W.S. Jang, I. Kim,

- J.H. Lee, S.Y. Park, K.S. Ryu, S.J. Seo, C.H. Kim, I.H. Lee // *Insect Molecular Biology*. – 2004. – V. 13. № 1. – P. 65–72.
281. Leggett, H. C. Generalism and the evolution of parasite virulence. / H. C. Leggett, A. Buckling, G. H. Long, M. Boots // *Trends in Ecology & Evolution*. – 2013. – 28. – 592-6.
282. Li, D. Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. / D. Li, C. Scherfer, A. M. Korayem, Z. Zhao, O. Schmidt, U. Theopold // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2002. – 32. – P. 919–928.
283. Li, X. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics / X. Li, M.A. Schuler, M.R. Berenbaum // *Annual Review of Entomology*. – 2007. – V. 52. – P. 231–253.
284. Liang, Z. Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferring chain / Z. Liang, L. Sottrup-Jensen, A. Aspan, M. Hall, K. Soderhall // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – V 94. № 13. – P. 6682–6687.
285. Lih-Brody, L. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease / L. Lih-Brody, S.R. Powell, K.P. Collier // *Digestive Diseases and Sciences*. – 1996. – 41. – P.2078–86.
286. Lively, C.M. Host-parasite coevolution and sex - Do interactions between biological enemies maintain genetic variation and cross-fertilization? / C.M. Lively // *Bioscience*. – 1996. – 46. – P. 107–114.
287. Loeb, M. J. Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. / M. J. Loeb, P. A. W. Martin, R. S. Hakim, S. Goto, M. Takeda // *Journal of Insect Physiology*. – 2001. – 47. – P. 599–606.
288. Lovgren, A. Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis* / A. Lovgren, M. Zhang, A. Engstrom, G. Dalhammar, R. Landén // *Molecular Microbiology*. – 1990. – V.4. – P. 2137–2146.

289. Luckhart, H. Morphological and functional classification of the hemocytes of adult female *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) / H. Luckhart, M.S. Cupp, E.W. M. Cupp // *Journal of Medical Entomology*. – 1992. – V. 29. –№ 3. – P. 457–466.
290. Luthy, P. Pathogenesis of Bt toxins. Chapter 3.1. / P. Luthy, M.G. Wolfersberger, // *Entomopathogenic bacteria from laboratory to field application*. Kluwer academic publishers. Netherlands. 2000. P. 172.
291. Ma, G. Insect tolerance to the crystal toxins Cry1Ac and Cry2Ab is mediated by the binding of monomeric toxin to lipophorin glycolipids causing oligomerization and sequestration reactions. / G. Ma, M. M. Rahman, W. Grant, O. Schmidt, S. Asgari // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2012. – 37. – P. 184–192.
292. Ma, G. Mechanisms of inducible resistance against *Bacillus thuringiensis* endotoxins in invertebrates / G. Ma, M. Sarjan, C. Preston, S. Asgari, O. Schmidt // *Insect Science*. – 2005. – V. 12. – P. 319–330.
293. Maagd, R.A. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world / R.A. Maagd, A. Bravo, N. Crickmore // *Trends in Genetics*. – 2001. – Vol. 17. No. 4. – P. 146.
294. Maagd, R.A. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria / R.A. Maagd, A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore, H.E. Schnepf // *Annual Review of Genetics*. – 2003. – 37. – P. 409–33.
295. Mak, P. A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi / P. Mak, A. Zdybicka-Barabas, M. Cytrynska // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2010. –V. 34. – P. 1129–1136.
296. Mamidala, P. Review. Metabolic resistance in bed bugs / P. Mamidala, C.J. Susan, O. Mittapalli // *Insects*. – 2011. – V. 2. – P. 36–48.
297. Manachini, B. Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) and their response to *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus*

- thuringiensis* / B. Manachini, V. Arizza, D. Parrinello, N. Parrinello // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2011. – V. 106. – P. 360–365.
298. Marmaras, V.J. Immune response in insects: The role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization / V.J. Marmaras, N.D. Charalambidis, C.G. Zervas // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. – 1996. – V. 31. – P. 119–133.
299. Marshall, O.J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR / O.J. Marshall // *Bioinformatics*. – 2004. – V. 12. – P. 20(15).
300. 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*. 2015a. V. 26, 10(6):e0130988.
301. 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*. – 2015b. V. 10, № 3. – e0121917.
302. 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*. – 2012a. – V. 6, № 4. – P. 507–518.
303. 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*. – 2012b. – V. 38, № 3. – P. 295–305.

304. Martin, J.S. Failure of tannic acid to inhibit digestion or reduce digestibility of plant protein in gut fluids of insect herbivores: Implications for theories of plant defense / J.S. Martin, M.M. Martin, E.A. Bernays // *Journal of Chemical Ecology*. – 1987. – V. 13. – P. 605–621.
305. Martinez-Ramirez, A. C. Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera : Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. / A. C. Martinez-Ramirez, F. Gould, J. Ferre // *Biocontrol Science and Technology*. – 1999. – 9. – P. 239–246.
306. McCord, J. M. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythro-cuprein (hemocuprein) / J. M. McCord, I. Fridovich // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1969. – V. 244. – P. 6049–6055.
307. Meister, M. The antimicrobial host defense of *Drosophila* / M. Meister, C. Hetru, J.A. Hoffmann // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2000. – V. 248. – P. 17–36.
308. Ment, D. *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface / D. Ment, G. Gindina, V. Soroker, I. Glazer, A. Rot, M. Samish // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2010. – V. 103. № 2. – P. 132–139.
309. Ment, D. Novel technique for quantifying adhesion of *Metarhizium anisopliae* conidia to the tick cuticle / D. Ment, G. Gindin, A. Rot, V. Soroker, I. Glazer, S. Barel, M. Samish // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2010a.– 76. – P. 3521–3528.
310. Meyling, N.V. Principles from community and metapopulation ecology: application to fungal entomopathogens / N.V. Meyling, A.E. Hajek // *BioControl*. – 2010. – V. 55. № 1. – P. 39–54.
311. Miller, J.S. Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in adults of the cricket, *Gryllus assimilis* / J.S. Miller, R.W. Howard, R.L. Rana, H. Tunaz, D.W. Stanley // *Journal of Insect Physiology*. – 1999. – V. 45. – P.75–83.

312. Milner, R.J. FI-1045: A profile of a commercially useful isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* / R.J. Milner, P.R. Samson, G.K. Bullard // Biocontrol Science and Technology. – 2002. – V. 12. № 1. – P.43–58.
313. Mitsui, J. Effect of larval phase on susceptibility of the armyworm, *Pseudaletia separate* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) to an entomogeneous deuteromycete, *Nomuraea rileyi* / J. Mitsui, Y. Kunimi // Japanese Journal Of Applied Entomology And Zoology. –1988. –V. 32. – P. 129–134.
314. Mohanty, S. S. Induction of chymoelastase (Pr1) of *Metarhizium anisopliae* and its role in causing mortality to mosquito larvae / S. S. Mohanty, K. Raghavendra, A.P. Dash // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2008. – V. 24. № 10. – P. 2283–2288.
315. Morin, S. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm / S. Morin, R.W. Biggs, M.S. Sisterson, L. Shriver, C.E. Kirk // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2003. – V. 100. – P. 5004–5009.
316. Mukherjee, K. *Galleria mellonella* as a model host to study gut microbe homeostasis and brain infection by the human pathogen *Listeria monocytogenes* / K. Mukherjee, R. Raju, R. Fischer, A. Vilcinskas // Yellow Biotechnology I: Insect Biotechnologie in Drug Discovery and Preclinical Research. – 2013. – 135. – P. 27–39.
317. Muta, T. The role of hemolymph coagulation in innate immunity / T. Muta, S. Iwanaga // Current Opinion in Immunology. – 1996. – V. 8. – P. 41–47.
318. Nappi, A. J. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. / A. J. Nappi, B. M. Christensen // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2005. – 35. – P. 443–459.
319. Nappi, A. The Role of melanization and cytotoxic by products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps / A. Nappi, M. Poirie, Y. Carton // Advances in parasitology. V. 70: Ed. Prevost G. Elsvier, 2009 P. 99–121.

320. Nappi, A.J. Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster* / A.J. Nappi, E. Vass // Journal of Parasitology. – 1998. – V. 84. № 6. – P. 1150–1157.
321. Nappi, A.J. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates / A.J. Nappi, E. Ottaviani // BioEssays. – 2000. – V. 22. – P. 469-480.
322. Nappi, A.J. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions / A.J. Nappi, E. Vass // Pigment Cell Research. – 1993. – V. 6. № 3. – P. 117–126.
323. Nappi, A.J. Superoxide anion generation in *Drosophila* during the melanotic encapsulation of parasites / A.J. Nappi, E. Vass, F. Frey, Y. Carton // European Journal of Cell Biology. – 1995. – V. 68. – P. 450–456.
324. Nation, J.L. Insect Physiology and Biochemistry. / J.L. Nation. - Second Edition CRC Press - 2008 - P.560
325. Nielsen-LeRoux, C. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts / C. Nielsen-LeRoux, S. Gaudriault, N. Ramarao, D. Lereclus, A. Givaudan // Current Opinion in Microbiology. – 2012. – 15. – P. 220–231.
326. Okstad, O.A. Sequence analysis of three *Bacillus cereus* loci carrying PicRregulated genes encoding degradative enzymes and enterotoxin / M. Gominet, B. Purnelle // Microbiology. – 1999. – V. 145. – P. 3129–3138.
327. Oppert, B. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella* / B. Oppert, K.J. Kramer, D.E. Johnson, S.C. MacIntosh, W.H. McGaughey // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1994. – V. 198. – P. 940–947.
328. Oppert, B. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. / B. Oppert, K. J. Kramer, D. E. Johnson, S. C. Macintosh, W. H. Mcgaughey // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1994. – 198. – P. 940–947.

329. Oppert, B., Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. / B. Oppert // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. – 1999. – 42. – P. 1–12.
330. Pardini, R.S. Adaptations to plant pro-oxidants in a phytophagous insect model: enzymatic protection from oxidative stress. / R.S. Pardini, C.A. Pritsos, S.M. Bowen, S. Ahmad, G.J. Blomquist // Oxygen radicals in biology and medicine. Simic M. G., Taylor K.A., Ward J.F., Sonntag C., eds. New York: Plenum Press. - 1988. - P.725–728.
331. Pardo-Lopez, L. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. / L. Pardo-Lopez, M. Soberon, A. Bravo // FEMS Microbiol Rev. – 2013. – 37. – P. 3–22.
332. Park, D.-S. Immunological detection of serpin in the fall webworm, *Hyphantria cunea* and its inhibitory activity on the prophenoloxidase system / D.-S. Park, S.W. Shin, S.-D. Hong, H.-Y. Park // Molecules and Cells. – 2000. – V. 10. № 2. – P. 186–192.
333. Pava-Ripoll, M. Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene / M. Pava-Ripoll, F. J. Posada, B. Momen, C. Wang, R. J. St. Leger // Journal of Invertebrate Pathology. – 2008. – Vol. 99. № 2. – P. 220–226.
334. Pavlick, K.P. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease / K.P. Pavlick, F.S. Laroux, J. Fuseler, R.E. Wolf, L. Gray, J. Hoffman, M.B. Grisham // Free Radical Biology and Medicine. – 2002. – V. 33. No. 3. – P. 311–322.
335. Paw, M. Worldwide abundance and distribution of Bt isolates / M. Paw, R.S. Travers // Applied and Environmental Microbiology. – 1991. – V. 55. – P. 2437–2422.

336. Pedras, M.S.C. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. Review / M.S.C. Pedras, L.I. Zaharia, D.E. Ward // *Phytochemistry*. – 2002. – V. 59. № 6. – P. 579–596.
337. Pigott, C.R. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity / C.R. Pigott, D.J. Ellar // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 2007. – P. 255–281.
338. Prabhakaran, S.K. Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of German cockroach, *Blattella germanica* (L.) / S.K. Prabhakaran, S.T. Kamble // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 1995. – V. 25. № 4. – P. 519–524.
339. Pritsos, C.A. Antioxidant enzymes of the black swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes*, and their response to the prooxidant allelochemical, quercetin / C.A. Pritsos, S. Ahmad, S.M. Bowen, A.J. Elliott, G.J. Blomquist, R.S. Pardini // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. – 1988. – 8. – P. 101–112.
340. Purwar, J.P. Synergistic effect of entomogenous fungi on some insecticides against bihar hairy caterpillar *Spilarctia obliqua* (Lepidoptera: Arctiidae) / J.P. Purwar, G.C. Sachan // *Microbiological Research*. – 2006. – V. 161 – P. 38–42.
341. Qazi, S. S. Hydrated conidia of *Metarhizium anisopliae* release a family of metalloproteases. / S. S. Qazi, G. G. Khachatourians // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2007. – 95. – P. 48–59.
342. Qazi, S. The role of nitric oxide in motoneuron spike activity and muscarinic-evoked changes in cGMP in the CNS of larval *Manduca sexta* / S. Qazi, B.A. Trimmer // *Journal of Comparative Physiology*. – 1999. – V.185. – P. 539–550.
343. Rahman, M. Developmental penalties associated with inducible tolerance in *Helicoverpa armigera* to insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* / M. Rahman, R. Glatz, R. Roush, O. Schmidt // *Applied and environmental microbiology*. – 2011. – Vol. 77. No. 4. – P. 1443–1448.
344. Rahman, M.M. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella* / M.M. Rahman, H.L.S. Roberts, M. Sarjan, S.

- Asgari, O. Schmidt // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – V. 101. No. 9. – P. 2696–2699.
345. Rahman, M.M. Tolerance to *Bacillus thuringiensis* endotoxin in immune-suppressed larvae of the flour moth *Ephesia kuehniella*. / M.M. Rahman, L.S. Harry, R.O. Schmidt // Journal of Invertebrate Pathology. – 2007. – V. 96. – P. 125–132.
346. Rajagopal, R. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by doublestranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor / R. Rajagopal, S. Sivakumar, N. Agrawal, P. Malhotra, R.K. Bhatnagar // The Journal of Biological Chemistry. – 2002. – V. 27. – P. 46849–46851.
347. Ramarao, N. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. / N. Ramarao, C. Nielsen-Leroux, D. Lereclus // Jove-Journal of Visualized Experiments.– 2012. – 11(70). – e4392.
348. Rantala, M.J. Analysis of the importance of genotypic variation, metabolic rate, morphology, sex and development time on immune function in the cricket, *Gryllus firmus* / M.J. Rantala, D.A. Roff // Journal of Evolutionary Biology. – 2006. – V. 19. – P. 834–843.
349. Raymond, B. A mid-gut microbiota is not required for the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* to diamondback moth larvae. / B. Raymond, P. R. Johnston, D. J. Wright, R. J. Ellis, N. Crickmore, M. B. Bonsall // Environmental Microbiology. – 2009. – 11. – P. 2556–2563.
350. Raymond, B. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? / B. Raymond, P.R. Johnston, C. Nielsen-LeRoux, D. Lereclus, N. Crickmore // Trends in Microbiology. – 2010. – Vol.18 No.5. – P. 189–194.
351. Raymond, B. Ecological consequences of ingestion of *Bacillus cereus* on *Bacillus thuringiensis* infections and on the gut flora of a lepidopteran host / B. Raymond, R.S. Lijek, R.I. Griffiths, M.B. Bonsall // Program and Abstracts 45th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology August 5-9.– 2012. – Centro de Convenciones de la UCA Puerto Madero, Buenos Aires, Argentina. – P. 33.

352. Reeson, A.F. Baculovirus resistance in the noctuid *Spodoptera exempta* is phenotypically plastic and responds to population density / A.F. Reeson, K. Wilson, A. Gunn, R.S. Hails, D. Goulson // Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences. – 1998. – V. 265. – P. 1787–1791.
353. Regev, A. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae / A. Regev, M. Keler, N. Strizhov // Applied and Environmental Microbiology. – 1996. – V. 62. – P. 3581–3586.
354. Rehner, S.A. *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs / S.A. Rehner, E.A. Buckley // Mycologia. – 2005. – V. 97. № 1. – P. 84–98.
355. Richards, D.M. Membrane proteins are critical targets in free radical mediated cytolysis / D.M. Richards, R.T. Dean, W. Jessup // Biochimica et Biophysica Acta. – 1988. V.946. – P. 281–288.
356. Richards, E.H. A recombinant immunosuppressive protein from *Pimpla hypochondriaca* (rVPr1) increases the susceptibility of *Lacanobia oleracea* and *Mamestra brassicae* larvae to *Bacillus thuringiensis* / E.H. Richards, M. P. Dani // Journal of Invertebrate Pathology. – 2010. – V. 104. – P. 51–57.
357. Rie, J.V. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* / J.V. Rie, W.H. McGaughey, D.E. Johnson, B.D. Barnett, H. Van Mellaert // Science. – 1990. – V. 247. – P. 72–74.
358. Rie, J.V. Specificity of *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects / J.V. Rie, S. Jansens, H. Hofte // European Journal of Biochemistry. – 1989. – V. 186. – P. 239–247.
359. Roberts, D. W. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects / D. W. Roberts , R. J. St. Leger // Advances in Applied Microbiology. – 2004. – V. 54. – P. 1–70.

360. Rosales, C. Phagocytosis, a cellular immune response in insects / C. Rosales - ISJ. – 2011. – V. 8. – P. 109–131.
361. Rowley, A. F. A histological study of wound healing and hemocyte function in the wax-moth *Galleria mellonella*. / A. F. Rowley, N. A. Ratcliffe // Journal of Morphology. – 1978. – 157. – P. 181–199.
362. Roy H.E. Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts / H.E. Roy, D.C. Steinkraus, J. Eilenberg, A.E. Hajek, J.K. Pell // Annual Review of Entomology. – 2006. – V. 51. – P. 331–357.
363. Roy, B.A. Evolutionary dynamics of pathogen resistance and tolerance. / B.A. Roy, J.W. Kirchner // Evolution. – 2000. – 54. – P. 51–63.
364. Rozen, S. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers / S. Rozen, H. Skaletsky // Methods in Molecular Biology. – 2000. – V. 132. – P. 365–386.
365. Rukmini, V. *Bacillus thuringiensis* crystal-endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin / C.Y. Reddy, G. Venkateswerlu // Biochimia. – 2000. – V.82. – P. 109–116.
366. Salamitou, S. The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. / S. Salamitou, F. Ramisse, M. Brehelin, D. Bourguet, N. Gilois, M. Gominet, E. Hernandez, D. Lereclus // Microbiology-Uk. – 2000. – 146. – P. 2825–2832.
367. Sampson, M.N. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects / M.N. Sampson, G.W. Gooday // Microbiology. – 1998. – V. 144. – P. 2189–2194.
368. Samuels, R.I. The role of destruxins in the pathogenicity of 3 stains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta* / R.I. Samuels, A.K. Charneley, S.E. Reynolds // Mycopathologia. – 1988. – V. 104. – P. 51–58.
369. Sarjan, M. Resistance against *Bacillus thuringiensis* endotoxins in a laboratory population of *Helicoverpa armigera* is based on an elevated immune status. / M. Sarjan, G. Ma, M.M. Rahman, O. Schmidt // Jurnal Ilmu dasar. – 2009. – V. 10. – N.1. – P. 77–84.

370. Schnepf, E.A. *B. thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins / E.A. Schnepf, N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler, D.H. B. Dean // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 1998. – Vol. 62. – P. 45–52.
371. Schuhmann B. Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater waxmoth larvae, *Galleria melonella* / B. Schuhmann, V. Seitz, A. Vilcinskas, L. Podsiadlowski // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. – 2003. – V. 53. – P. 125–133.
372. Scott, J.G. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg / J.G. Scott, Z. We // *Pest Management Science*. – 2001. – V. 57. № 10. – P. 958–967.
373. Segond, D. Iron acquisition in *Bacillus cereus*: The roles of IIsA and bacillibactin in exogenous ferritin iron mobilization. / D. Segond, E. A. Khalil, C. Buisson, N. Daou, M. Kallassy, D. Lereclus, P. Arosio, F. Bou-Abdallah, C. N. Le Roux // *PLOS Pathogens*. – 2014. – 10.
374. Serebrov, V.V. Spontaneous variability of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. strains as an approach for enhancement of insecticidal activity / V.V. Serebrov, A.A. Maljarchuk, M.V. Shternshis // *Plant sci. (Sofia)*. – 2007. – V. 44. № 3. – P. 236–239.
375. Shrestha, S. Oenocytoid cell lysis to release prophenoloxidase is induced by eicosanoid via protein kinase C / S. Shrestha, Y. Kim // *Journal of Asia-Pacific Entomology*. – 2009. – V. 12. № 4. – P. 301–305.
376. Shrestha, S. Two chemical derivatives of bacterial metabolites suppress cellular immune responses and enhance pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella* / S. Shrestha, Y.P. Hong, Y. Kim // *Journal of Asia-Pacific Entomology*. – 2010. – V. 13. № 1. – P. 55–60.
377. Sideri, M. Innate immunity in insects: surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes / M. Sideri, S. Tsakas, E. Markoutsas, M. Lampropoulou, V.J. Marmaras // *Immunology*. – 2008. – V. 123. № 4. – P. 528–537.

378. Slepneva, I. A. Influence of fungal infection on the DOPA-semiquinone and DOPA-quinone production in haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. / I. A. Slepneva, D. A. Komarov, V. V. Glupov, V. V. Serebrov, V. V. Khramtsov // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2003. – 300. – P. 188–191.
379. Smirnoff, W.A. Field test of the effectiveness of chitinase additive to *Bacillus thuringiensis* Berliner against *Choristoneura fumiferana* / W.A. Smirnoff, A.P. Randall, R. Martineau // Canadian Journal of Forest Research. – 1973. – V. 3. – P. 226–236.
380. Smith, R.J. Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana* / R.J. Smith, E.A. Grula // Journal of Invertebrate Pathology. – 1982. – V. 39. № 1. – P. 15–22.
381. Snyder, M.J. Molecular phylogeny of glutathione-S-transferases / M.J. Snyder // DNA and Cell Biology. – 1997. – V. 16. № 11. – P. 1373–1384.
382. Soderhall, K. Effect of quinones and melanin on mycelial growth of *Aphanomyces* spp., and extracellular protease of *Aphanomyces astaci*, a parasite on crayfish / K. Soderhall, R. Ajaxon // Journal of Invertebrate Pathology. – 1982. – V. 39. – P. 105–109.
383. Sree, K.S. Destruxin from *Metarhizium anisopliae* induces oxidative stress effecting larval mortality of the polyphagous pest *Spodoptera litura* / K.S. Sree, V. Padmaja // Journal of Applied Entomology. – 2008. – V. 132. № 1. – P. 68–78.
384. St. Leger, R. J. 1988. The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium anisopliae*. / R. J. St. Leger, R. M. Cooper, A. K. Charnely // Journal of Invertebrate Pathology. – 52. – P. 459–470.
385. St. Leger, R.J. Construction of an improved mycoinsecticide over-expressing a toxic protease / R.J. St. Leger, L. Joshi, M. J. Bidochka, D. W. Roberts //

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1996. – Vol. 93, N 13. – P. 6349–6354.
386. St. Leger, R.J. The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium anisopliae* / R.J. St. Leger, R.M. Cooper, A.K. Charnley // Journal of Invertebrate Pathology. – 1988. – V. 52. – P. 459–470.
387. St. Leger, R.J. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects / R.J. St. Leger // Canadian Journal of Botany. – 1995. – V. 73. – P. 1119–1125.
388. Staheli, J.P. CODEHOP PCR and CODEHOP PCR primer design / J.P. Staheli, R. Boyce, D. Kovarik, T.M. Rose // Methods in Molecular Biology. – 2011. – V. 687. – P. 57–73.
389. Strand, M.R. Characterization of monoclonal antibodies to hemocytes of *Pseudoplusia includens* / M.R. Strand, R. Johnson, A. Jena // Journal of Insect Physiology. – 1996. – V. 42. № 1. – P. 21–31.
390. Strand, M.R. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships / M.R. Strand, L.L. Pech // Annual Review of Entomology. – 1995. – V. 40. – P. 31–56.
391. Strand, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity / M.R. Strand // Insect immunology. UK: Elsevier, - 2008 - P. 25–47.
392. Sugumaran, M. Unified mechanism for sclerotization of insect cuticle / M. Sugumaran // Advances in Insect Physiology. – 1998. – V. 27. – P. 229–334.
393. Sugumaran, M., Chemistry of sclerotization / M. Sugumaran // Advances in Insect Physiology. – 2010. – V. 39. – P. 151–200.
394. Tabashnik, B.E. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. / B.E. Tabashnik, J.B. Van Rensburg, Y. Carrière // Journal of Economic Entomology. 2009 Dec;102(6):2011-25.
395. Tabashnik, B.E. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. / B.E. Tabashnik, Y.B. Liu, T. Malvar, D.G. Heckel, L. Masson // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1997. – V. 94. – P. 12780–12785.

396. Tan, Y. Deletion of *aprA* and *nprA* genes for alkaline protease A and neutral protease A from *Bacillus thuringiensis*: effect on insecticidal crystal proteins / Y. Tan, W.P. Donovan // *Journal of Biotechnology*. – 2000. – V.84. – P. 67–72.
397. Tang, H. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila* / H. Tang // *Landes Bioscience*. – 2009. – Vol. 3 (1). – P. 105–111.
398. Thamthiankul, S. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Pakistani* / S. Thamthiankul, S. Suan-Ngay, S. Tantimavanich // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2001. – V. 56. – P. 395–401.
399. Theopolda, U. The coagulation of insect hemolymph / U. Theopolda, D. Lib, M. Fabbrib, C. Scherfera, O. Schmidt // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2002. – V. 59. – P. 363–372.
400. Thomsen, L. Time-concentration mortality of *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) and *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae from different destruxins / L. Thomsen, J. Eilenberg // *Environmental Entomology*. – 2000. – V. 29. № 5. – P. 1041–1047.
401. Tojo, A. Effects of the three proteases from gut juice of the silkworm, *Bombyx mori*, on the two morphologically different inclusions of δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 strain / A. Tojo, W. Samasanti, N. Yoshida // *Agricultural and Biological Chemistry*. – 1986. – V. 50. – P. 575–580.
402. Tsakas, S. Insect immunity and its signalling: an overview / S. Tsakas, V.J. Marmaras // *Invertebrate Survival Journal* – 2010. – V. 7. – P. 228–238.
403. Vallet-Gely, I. Bacterial strategies to overcome insect defences / I. Vallet-Gely, B. Lemaitre, F. Boccard // *Nature Reviews Microbiology*. – 2008. – V. 6. – P. 302–313.
404. van Frankenhuyzen, K. Interactions between *Bacillus thuringiensis subsp kurstaki* HD-1 and midgut bacteria in larvae of gypsy moth and spruce budworm. / K. van Frankenhuyzen, Y. H. Liu, A. Tonon // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2010. – 103. – P. 124–131.

405. Vankova, J. Natural epizootic caused by bacilli of the species *Bt* and *B cereus* / J. Vankova, K. Purrini // *Zeits Angew Entom.* – 1979. – V. 88. – P. 216–221.
406. Vass, E. Fruit fly immunity / E. Vass, A.J. Nappi // *Bioscience.* – 2001. – V 51. – P. 529–535.
407. Vega, F.E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology / F.E. Vega, M.S. Goettel, M. Blackwell, D. Chandler, M.A. Jackson, S. Keller, M. Koike, N.K. Maniana, A. Monzon, B.H. Ownley, J.K. Pell, D.E.N. Rangel, H.E. Roy // *Fungal Ecology.* – 2009. – V. 2. – P. 149–159.
408. Vidal, C. Climatic constraints for fungal biopesticides / C. Vidal, J. Fargues // *Use of entomopathogenic fungi in biological pest management* Eds. Ekesi S., Maniana N.K. Kerala, India: Research Signpost. 2007. P. 39–55.
409. Vilcinskas, A. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella* / A. Vilcinskas, V. Matha, P. Gotz // *Journal of Insect Physiology.* – 1997 b. – V. 43. № 12. – P. 1149–1159.
410. Vilcinskas, A. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. / A. Vilcinskas, V. Matha, P. Göz // *Journal of Insect Physiology.* – 1997. – 43. – P. 1149–1159.
411. Vilcinskas, A. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites / A. Vilcinskas, V. Matha, P. Gotz *Journal of Insect Physiology.* – 1997a. V. 43. № 5. – P. 475–483.
412. Vilcinskas, A., Coevolution between pathogen-derived proteinases and proteinase inhibitors of host insects. / A. Vilcinskas // *Virulence.* – 2011. – 1. – P. 206–214.
413. Vilcinskas, A.A. NTI-infective therapeutics from the lepidopteran model host *Galleria mellonella* / A. Vilcinskas // *Current Pharmaceutical Design.* – 2011a. – 17. – P. 1240–1245.

414. Vogel, H. comprehensive transcriptome and immunegene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella* / H. Vogel, B. Altincicek, G. Glöckner, A. A. Vilcinskas // BMC Genomics. – 2011. – 12. – P. 308.
415. Volwerk, J. J. Functional characteristics of phosphatidylinositol specific Phospholipases-C from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* / J. Volwerk, J. A. Koke, P. B. Wetherwax, O. H. Griffith // Fems Microbiology Letters. – 1989. – 61. – P. 237–242.
416. Wang, C. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. / C. Wang, R.J. St. Leger // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – 103. – P. 6647–6652.
417. Wang, C. Detection and characterisation of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* / C. Wang, M.A. Typas, T.M. Butt // FEMS Microbiology Letters. – 2002. – V. 213. № 2. – P. 251–255.
418. Wang, C. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* / C. Wang, R. J. St. Leger // Eukaryotic Cell. - 2005. - 4, - P.937-947.
419. Wang, Ch. Genomics of entomopathogenic fungi / Ch. Wang, R.J. St. Leger // The Ecological genomics of fungi, first edition. Ed. F. Martin. John Wiley & Sons, Inc. Published, - 2014. - P. 243–260.
420. Wang, Q. Immune responses of *Helicoverpa armigera* to different kinds of pathogens / Q. Wang, Y. Liu, H.J. He, X.F. Zhao, J.X. Wang // BMC Immunology. – 2010. – V. 11:9.
421. Wang, Y. Antioxidant defense systems of two lepidopteran insect cell lines / Y. Wang, L.W. Oberley, D.W. Murhammer // Free radical biology and medicine. – 2001. – Vol. 30 No 11. – P. 1254–1262.
422. Wang, S. Comparative genomics using microarrays reveals divergence and loss of virulence-associated genes in host-specific strains of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* / S. Wang, A. Leclerque, M. Pava-Ripoll, W. Fang, R. J. St. Leger // Eukaryotic Cell. – 2009. – Vol. 8. N 6. – P. 888–898.

423. Wiesner, J. Antimicrobial peptides The ancient arm of the human immune system. / J. Wiesner, A. Vilcinskas // *Virulence*. – 2010. – 1. – P. 440–464.
424. Willoughby, L. A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and Phenobarbital / L. Willoughby, H. Chung, C. Lumb, C. Robin, P. Batterham, P.J. Daborn *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2006. – V. 36. – P. 934–942.
425. Willson, R.L. Organic peroxy free radicals as ultimate agents in oxygen toxicity / R.L. Willson. *Oxidative Stress*. L.:Acad. Press. - 1985. - P.41-72.
426. Wilson, K. Coping with crowds: Density-dependent disease resistance in desert locusts / K. Wilson, M. B. Thomas, S. Blanford, M. Doggett, S. J. Simpson, S. L. Moore // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2002. – 99. – P. 5471–5475.
427. Wilson, K. Coping with crowds: Density-dependent disease resistance in desert locusts / K. Wilson, M. B. Thomas, S. Blanford, M. Doggett, S. J. Simpson, S. L. Moore // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2002. – 99. – P. 5471–5475.
428. Wilson, K. Density-dependent prophylaxis: evidence from Lepidoptera-baculovirus interactions? / K. Wilson, A. F. Reeson // *Ecological Entomology*. – 1998. – 23. P. 100–101.
429. Wilson, K. Melanism and disease resistance in insects / K. Wilson, S.C. Cotter, A.F. Reeson, J.K. Pell // *Ecology Letters*. – 2001. – V. 4. – P. 637–649.
430. Wojda, I. Humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae after infection by *Beauveria bassiana* under optimal and heat-shock conditions / I. Wojda, P. Kowalski, T. Jakubowicz // *Journal of Insect Physiology*. – 2009. – V. 55. – P. 525–531.
431. Wojda, I. Humoral immune response upon mild heat-shock conditions in *Galleria mellonella* larvae / I. Wojda, T. Jakubowicz // *Journal of Insect Physiology*. – 2007. – V. 53. – P. 1134–1144.
432. Wojda, I. JNK MAP kinase is involved in the humoral immune response of the greater wax moth larvae *Galleria mellonella* / I. Wojda, P. Kowalski, T.

- Jakubowicz // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 2004. V. 56. P. 143–154.
433. Wong, G. W. Tumor necrosis factor alpha selectively sensitizes human immunodeficiency virus-infected cells to heat and radiation / G. W. Wong, T. M. McHugh, R. Weber, D. V. Goeddel // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1991. – 88. – P. 4372–4376.
434. Wraight, S.P. Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests / S.P. Wraight, G.D. Inglis, M.S. Goettel ed. Lacey L.A., Kaya H.K. // Field manual of techniques in invertebrate pathology. Springer, - 2007. - P. 223–248.
435. Xiao, G. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana* / G. Xiao, S.-H. Ying, P. Z.-L. Zheng, Wang, S. Zhang, X.-Q. Xie, Y. Shang, R.J. St. Leger, G.-P. Zhao, C. Wang, M.-G. Feng // Scientific research. – 2012. – V. 2. – P. 483.
436. Xu, X.X. *Manduca sexta* gloverin binds microbial components and is active against bacteria and fungi / X.X. Xu, X. Zhong, H.Y. Yi, X.Q. Yu // Developmental and Comparative Immunology. – 2012. – 38(2). – P. 275–84.
437. Yamamoto, T. Chapter 2.2. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests / T. Yamamoto, D.H. Dean // Entomopathogenic Bacteria from Laboratory to field Application. Kluwer academic publishers. Netherlands. 2000. p. 81-100.
438. Yamvrias, C. Contribution a l'étude du mode d'action de *Bacillus thuringiensis* vis-a-vis de la teigne de la farine, *Anagasta kuhniella* Zell.(Lepidoptera) / C. Yamvrias // Entomophaga. – 1962. – V.7. – P. 101–159.
439. Yang, W. Functional divergence among silkworm antimicrobial peptide paralogs by the activities of recombinant proteins and the induced expression profiles / W. Yang, T. Cheng, M. Ye, X. Deng, H. Yi // PLoS ONE. – 2011. – V. 6(3). – e18109.

440. Yeung, T. Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis / T. Yeung, B. Ozdamar, P. Paroutis, S. Grinstein // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2006. – V. 18. № 4. – P. 429–437.
441. Yu, C. G. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. / C. G. Yu, M. A. Mullins, G. W. Warren, M. G. Koziel, J. J. Estruch // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1997. – 63. P. 532–536.
442. Zaidman-Re´my, A. Drosophila Immunity: Analysis of PGRP-SB1 Expression, Enzymatic Activity and Function / A. Zaidman-Re´my, M. Poidevin, M. Herve´, D.P. Welchman, J.C. Paredes, C. Fahlander, H. Steiner, D. Mengin-Lecreulx, B. Lemaitre // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6(2). – e17231.
443. Zdybicka-Barabas, A. Synergistic action of *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme against Gram-negative bacteria / A. Zdybicka-Barabas, P. Mak, A. Klys // *Biochimica et Biophysica acta*. – 2012. – V. 1818. – P. 2623–2635.
444. Zhang, M.-Y. Cloning and sequencing of a lactamase-encoding gene from the insect pathogen *Bacillus thuringiensis* / M.-Y. Zhang, A. Lovgren // *Gene*. – 1995. – V. 158. – P. 83–86.
445. Zhang, X. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* / X. Zhang, N.B. Candas, R. Griko, Taussig, L. A. Bulla // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – V. 27. 103 (26). – P. 9897–902.
446. Zhang, X. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells / X. Zhang, N.B. Candas, L. Griko, Rose-Young, L.A. Bulla // *Cell Death & Differentiation*. – 2005. – V. 12(11). – P. 1407–16.
447. Zheng, P. Genetics of Cordyceps and related fungi / P. Zheng, Y. Xia, S. Zhang, Ch. Wang // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – V. 97. – P. 2797–2804.

448. Zheng, P. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional chinese medicine / P. Zheng, Y. Xia, G. Xiao, Ch. Xiong, X. Hu, S. Zhang, H. Zheng, Y. Huang, Y. Zhou, S. Wang, G.-P. Zhao, X. Liu, R.J. St. Leger, Ch. Wang // *Genome Biology*. – 2011. – V. 12. № 11.– 116.
449. Zibae, A. Effect of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, and its secondary metabolite on detoxifying enzyme activities and acetylcholinesterase (AChE) of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae) / A. Zibae, A.R. Bandani, M. Tork // *Biocontrol Science and Technology*. – 2009. – V. 19. № 5. – P. 485–498.
450. 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.
451. Chain, B.M. Hemocyte heterogeneity in the cockroach *Periplaneta americana* analysed using monoclonal antibodies / B.M. Chain, K. Leshon-Sorland, M.T. Siva-Jothy // *Journal of Cell Science*. – 1992. – V. 103. – P. 1261–1267.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1 Список изучаемых нуклеотидных последовательностей (генов и контигов)

Ген/контиг	Ссылка на последовательность	Предполагаемая функция/процесс	Прямой праймер	Обратный праймер
Гены "референсный" 18S rRNA	AF286298	Housekeeping	CACATCCAAGGAA GGCAG	AGTGTACTCATTCCGA TTACGA
Гены "референсный" EF1: Elongation factor 1-alpha (Ef-1a)	AF423811	Housekeeping	AACCTCCTTACAG TGAATCC	ATGTTATCTCCGTGCC AG
Галлеримицин	AF453824	Антимикробный белок (АМБ)	GAAGTCTACAGAA TCACACGA	ATCGAAGACATTGACA TCCA
Галиомицин	AY528421	АМБ	GTGCGACGAATTA CACCTC	TACTCGCACCAACAAT TGAC
Гловерин	AF394588	АМБ	AGATGCACGGTCC TACAG	GATCGTAGGTGCCTTG TG
Цекропин-Д	contig19824_1.exp см. Vogel et al., 2011	АМБ, Цекропин-Д	CTGCGCCATGTTCT TCA	TCGCATCTCTGATCCT CTG
6-Тох	AF394584	АМБ	GCGAACTGCGAAG AATTATC	TGTCTGTCTTGAGTTG CATATTG
Трансферрин	AY364430	Хелатор	CGTAGCAGTCATC AAGAAGG	CGCACTACTAGAACT GG
IMP1	AY330624	Ингибитор индуцибельных металлопротеаз микробов	TAGTAAGCAGTAG CATAGTCC	GCCATCTTCACAGTAG CA
2GM Контиг 20004	contig20004_1.fl.exp	Рецептор связывания вирусов, фактора некроза опухоли, сигнальная трансдукция	TACACATGCGGCC TACCTCT	AATCGCACACGTCACT CAAAC
6GM Контиг 5976	GME-string_Contig_5976.0	Нуклеозиддифосфаткиназная активность / регуляция апоптоза	TAGATACCGAGAG CGCCAGT	GACCCAGCATCTGTCT CCAT
7GM Контиг 21310	contig21310_1.exp	Участие в функционировании БТШ 70	GCAGCCTAACGA CCTGTTC	GTACACCTCAACCCCA GGAA

Ген/контиг	Ссылка на последовательность	Предполагаемая функция/процесс	Прямой праймер	Обратный праймер
Контиг 17373	contig17373_1.exp	Глутатион пероксидаза / регуляция ОВ баланса	CCACACTGTGAGG CAACATT	GTTTGCTTAGCACGGT CACA
Контиг 15265	contig15265_1.fl.exp	рецептор связывания с G-белком	CACACTGCAGGGC TTGTTTA	CCGTCCATCCTGACGT CTAT
Контиг 1489	GME-string_Contig_1489.0	Шаперон	ATCAAACGGTGTG CACGTAA	GTTTCCGAAGAGGGG AAAAC
Контиг 03093	contig03093_1.exp	Пероксиредоксин / регуляция ОВ баланса	CTGACAATGACCG TGCACTT	TCTACGGGTGTAGCGA CCTT
Контиг 704	GME-string_Contig_704.0	Фактор роста/ пролиферация клеток	GAGGTGCCTGGTC AGAATGT	TGGGGTCACTATTTCG TTTC
Контиг 233	GME-string_Contig_233.0	Фактор роста, миграция клеток /пролиферация клеток	CGTGACGAGTGAG ATCGTTG	CGGTTGTTGTCTCCGT TACA
Контиг 14880	contig14880_1.fl.exp	Регуляция апоптоза / сигнальная трансдукция	AAATTCTAGCCCGAG AGGA	CAAGAAGCAACAGCATTGG A
Контиг 20582	contig20582_1.exp	Регуляция воспаления / сигнальная трансдукция / метаболизм фенилаланина и тирозина	GGTGAGCGTTGTTCCA GACT	ATCCTATCCGAAGGGACAC C
Контиг 15362	contig15362_1.exp	Регуляция апоптоза / воспаления	CGAGCTAAGACAGGC GATT	CACCTGCGGTTGAATCATA
Контиг 19932	contig19932_1.fl.exp	Сигнальная трансдукция / активация иммунитета	AGACCCGCTATCCAAA ACCT	ATCCAGCAATTCATCTGC
БТШ 90	см. (Xu et al., 2011)	Шаперон	GCRTCVCGYATGG AGGAAGT	GAACTAAATCAGTCTT TGG

CCAGAGGCTGT **A**CTTCGATATTGGCACCCCTG**T** ACCAGAGATTGCTGATTATTTCTATCCACAAGTTTTC
 GGCGGTGCCCCGGCCGACAAAGAGAAGGCCTCCAAAATCGAAGACTCTCTTAAGCTCCTGGACACATTCC
 TTGAGGGCCAGAAATACGTGGCAGGCCCAACCTCACTGTCGCCGATCTGAGTCTCATCGCGAGCGTATC
 CAGCTTCGAGGCATCCGATATTGACTTCAAGAAATACCCTAATGTTAAGAGATGGTACGAGACAGTGAGG
 AGCACCCGACCAGGATACCAAGAGGCTAACGAGAAAGGACTGGAGGCGTTCAAGGGGCTCGTCAACAGCA
 T**G**CTC**AAG**AAGTGAACGAGGG**C**TGA**GAA**GCTTTTAAAATTTTGTTACGAAATTTTACACTTTACGAATAA
 GTAAAGCCACCGTATTCTCAAATTTAACACCGTTTTCCATGTTACTTATTAATATAAGTTTAGTGATAAG
 GCACAAATAAATTATAT**TGTATTA**AAAAAAAAAAAAAAAAA

Праймер (LF)	Праймер (RF)	размер продукта	Коэффициент качества праймеров
CAACAAATATGGCAAGGGCT	GCCCTCGTTCACCTTCTTGAG	435	0.0507
CAACAAATATGGCAAGGGCT	CCCTCGTTCACCTTCTTGAGC	434	0.0507
CTTCGATATTGGCACCCCTGT	TCAGCCCTCGTTCACCTTCTT	363	0.0554
ACTTCGATATTGGCACCCCTG	TCAGCCCTCGTTCACCTTCTT	364	0.0554
CTTCGATATTGGCACCCCTGT	TTCTCAGCCCTCGTTCACCTT	366	0.0554

FPx, glutathione peroxidase

(Sequence reference: contig17373_1.exp, BAE07196.1)

Выбор различных участков гена для сайленсинга:

TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTGCAAAATGTTTTTAATTCGAAATATCTCTTAAGTACCTTTTATAAATT
 GACTATTACGATAAAAATTTAAGAGAATACTATTAACACACCATAAAAAAACTACATACTGTAAAAAGA
 TTTCTAGGTAAAATAAAAACATGATGATAAAATGCACTTTATAACATTAAAAATTAAACTTGTATTTTT
 AATTTAACATTTTAGTTCTTTTCATCAGTAAAATGTTACCTACACGCACTTTGAATGCTAAAGTAATAGGA
 GTTGATTATTATCAAGAATGTCTTCACCAATATTTTTCCAAAGACTTGACCAAATCTTTAGGATCTACAT
 TGGGTCCATGTCGTTCAACAGGAACTCCGTCCTGTCCACAATGAATTTTCGTAATAATCCACTTAATTGA
 ACTGCCAGGGTACCGCCTGTTTATGCTTTAAGAATTTCCATAATTGGCTAGCATTGTCCCCATTAACA
 TCGATTTTTTCAAACAAATCGAATTTCACTTTGCGATCA GCAGCGAAACAAACGATGTCTT CGGAGTTTC
 CTGGTTCTTG ACCGGCGAATTGGTTGCAGGGAAATGCCAGGATTCGCAATCCTTTAGTCTCTGCATATTG
 TTCGTATAGTTCATTAAGTTGTTTGTAGTTATTTGCAGTAAGACCACACTGTGAGGCAACATTCACAATA
 ATACAAACGTGACCTTTGTATATATCTAGTTTACATCAGCACCTTTATATTTTTGACGGTGAATTCAT
 GAATAGACGTAGCCGACTTAAAATCGGGATATCCACTGCCATTTTGCTGCAAAAAAGTATTGTGCTAAA
 TTGTGACCGTGCTAAGCAAAC TACATTAATAATAAGGTACAATAAGCTTCGATACCGCTTTAGAACCA
 ATTGTCATAGTGACGGTATGTCTTATTTAAAGGAAAAATGAAAGTAACTATACACTTATCACCATAAA
 TCTATTGCGGTGATAAAAATAGCAATTGGTTACACTTCGATTACACAACAATAACAGATTACTTAGA
 AAAAAA

Праймер (LF)	Праймер (RF)	размер продукта	Коэффициент качества праймеров
GGCTAGCATTGTCCCCATTA	GTTTGCTTAGCACGGTCACA	394	0.1659
CGAATTTCACTTTGCGATCA	GTTTGCTTAGCACGGTCACA	352	0.2792

TCGGAGTTTCCTGGTTCTTG	GTTTGCTTAGCACGGTCACA	311	0.3128
CGGAGTTTCCTGGTTCTTGA	GTTTGCTTAGCACGGTCACA	310	0.3128
GGCTAGCATTGTCCCCATTA	CAGCAAAATGGCAGTGGATA	353	0.3893

Приложение 3 Суммарные данные по статистике: размер выборки и используемый анализ

Рисунок	№ страницы	n на вариант	Насекомых на n	Нормальность распределения данных (тест Д'Агостино) да/нет	Метод используемый для расчетов статистической значимости
Рисунок 1	87	200	1	-	метод Каплана Майера
Рисунок 2	88	200	1	-	метод Каплана Майера
Рисунок 3	90	200	1		метод Каплана Майера
Рисунок 4	91	200	1	-	метод Каплана Майера
Рисунок 5 А,Б	92	200 (А), 200 (Б)	1	-	метод Каплана Майера
Рисунок 6	93	100	1	да	Т-Тест
Рисунок 7	96	3	5	нет	однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 8	97	150	1		метод Каплана Майера
Рисунок 9 А,Б	98	50 (А), 50 (Б)	5	да	Т-Тест
Рисунок 10	101	3	5	нет	однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 11	103	60*	1	да	многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферони

Рисунок	№ страницы	n на вариант	Насекомых на n	Нормальность распределения данных (тест Д'Агостино) да/нет	Метод используемый для расчетов статистической значимости
Рисунок 12	105	60*	3	да	многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферони
Рисунок 13	106	60*	3	да	многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферони
Рисунок 14	107	120*	1	да	многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферони
Рисунок 15	109	60*	3	да	многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферони
Рисунок 16	110	60*	1	да	многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферони
Рисунок 17	111	60*	1	да	многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферони
Рисунок 18	113	3	5		однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 19	114	3	5		однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 20	116	150	1		метод Каплана Майера

Рисунок	№ страницы	n на вариант	Насекомых на п	распределения данных (тест Д'Агостино)	да/нет	Метод используемый для расчетов статистической значимости
Рисунок 21 А,Б	118	120 (А), 60 (Б)	А (1), Б (3)	да		Т-Тест
Рисунок 22	120	100	1	да		многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони
Рисунок 23	122	3	5	нет		однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 24	123	3	5	нет		однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 25	124	3	5	нет		однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 26	130	60	5	да		однофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони
Рисунок 27	131	60	3	да		однофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони
Рисунок 28	133	60	3	да		однофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони

Рисунок	№ страницы	n на вариант	Насекомых на п	распределения данных (тест Д'Агостино)	да/нет	Метод используемый для расчетов статистической значимости
Рисунок 29	133	60	3	да		однофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони
Рисунок 30	134	60	3	да		однофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони
Рисунок 31	136	90	3	да		однофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони
Рисунок 32	137	60	5	да		однофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони
Рисунок 33	138	60	3	да		однофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони
Рисунок 34	140	3	5	нет		однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 35	141	3	5	нет		однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 36	142	3	5	нет		однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана

Рисунок	№ страницы	n на вариант	Насекомых на n	Нормальность распределения данных (тест Д'Агостино) да/нет	Метод используемый для расчетов статистической значимости
Рисунок 37	143	3	5	нет	однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 38	144	150	1	-	метод Каплана Майера
Рисунок 39	146	3	5	нет	однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 40	147	3	5	нет	однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 41	150	4	5	нет	однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 42	151	4	5	нет	однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 43 А,Б	152	4	5	нет	однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана

Рисунок	№ страницы	n на вариант	Насекомых на n	Нормальность распределения данных (тест Д'Агостино) да/нет	Метод используемый для расчетов статистической значимости
Рисунок 44	161	200	1	-	метод Каплана Майера
Рисунок 45 А,Б	163	20 (А), 20 (Б)	А (1), Б (1)	А (нет), Б (да)	А (тест Мана-Уитни), Б (однофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони)
Рисунок 46	165	30*	1	да	Т-Тест
Рисунок 47	167	120*	А (1), Б (3)	да	А, Б (многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони)
Рисунок 48	168	30*	1	да	многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони
Рисунок 49	169	60*	3	да	многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони
Рисунок 50	170	60*	3	да	многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони
Рисунок 51	172	3*	5	нет	однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 52	173	100	1	нет	Т-Тест
Рисунок 53	175	200	1	-	метод Каплана Майера

Рисунок	№ страницы	n на вариант	Насекомых на n	Нормальность распределения данных (тест Д'Агостино) да/нет	Метод используемый для расчетов статистической значимости
Рисунок 54 А,Б	181	200 (А), 200 (Б)	1	-	метод Каплана Майера
Рисунок 55	183	60	3	да	многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферони
Рисунок 56	184	120	1	да	многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферони
Рисунок 57	185	60	3	да	многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферони
Рисунок 58	186	60	3	да	многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферони
Рисунок 59	189	3	5	нет	однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 60	191	3	5	нет	однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 61	193	3	5	нет	однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана

Рисунок	№ страницы	n на вариант	Насекомых на n	Нормальность распределения данных (тест Д'Агостино) да/нет	Метод используемый для расчетов статистической значимости
Рисунок 62	195	3	5	нет	однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана
Рисунок 63 А,Б	197	90 (А), 90 (Б)	1	да	Т-Тест

* - указано где n представленно на вариант и одну временную точку

Влияние селекции на устойчив ость		Базовый уровень		Инфицирование <i>V. bassiana</i>		Инфицирование <i>M. robertsii</i>	
		Жировое тело	Покровы	Жировое тело	Покровы	Жировое тело	Покровы
	Окислительно- восстановительный баланс			Селекция не оказывает влияние на уровень экспрессии	Селекция не оказывает влияние на уровень экспрессии	Селекция не оказывает влияние на уровень экспрессии	Селекция не оказывает влияние на уровень экспресси и
	шапероны			Селекция не оказывает влияние на уровень экспрессии	Селекция не оказывает влияние на уровень экспрессии	Селекция не оказывает влияние на уровень экспрессии	Селекция не оказывает влияние на уровень экспресси и

Приложение 5

Анализ общей экспрессии генов в жировом теле и покровах личинок селектированной (25 поколений направленного отбора по принципу устойчивости к грибу *B. bassiana* (Bb) и контрольной (не селектированной) линий вощинной огневки на первые сутки после заражения грибами *B. bassiana* и *M. robertsii* (многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферони)

	Селектированная линия		Контрольная линия	
	Жировое тело	Покровы	Жировое тело	Покровы
Экспрессия генов в зависимости от микоза	Нет достоверного эффекта	<i>B. bassiana</i> запускает экспрессию генов достоверно выше чем <i>M. robertsii</i> P<0.05	<i>M. robertsii</i> запускает экспрессию генов достоверно выше чем <i>B. bassiana</i> . P<0.0001	<i>M. robertsii</i> запускает экспрессию генов достоверно выше чем <i>B. bassiana</i> . P<0.05