

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

**На правах рукописи**

**УДК 592**

**Черткова Екатерина Анатольевна**

**Изменение уровня дофамина при развитии инфекционных процессов,  
вызванных энтомопатогенными бактериями и грибами у насекомых отрядов  
*Lepidoptera* и *Coleoptera***

**03.02.05 – энтомология**

**Диссертация на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:**

**доктор биологических наук, профессор**

**В.В. Глупов**

**Новосибирск - 2016**

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	стр.
<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>6</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>12</b>
1.1. Особенности организма насекомых.....	12
1.1.1. Нейроэндокринная система и нейрогормоны насекомых.....	13
1.1.2. Кутикула.....	26
1.1.3. Пищеварительная система.....	27
1.1.4. Иммунная система.....	29
1.1.4.1. Клеточный иммунитет.....	29
1.1.4.2. Гуморальный иммунитет.....	31
1.1.4.3. Детоксицирующая система.....	36
1.2. Энтомопатогенные микроорганизмы.....	37
1.2.1. Энтомопатогенные бактерии <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	37
1.2.2. Энтомопатогенные грибы <i>Metarhizium robertsii</i> и <i>Beauveria bassiana</i> .....	40
1.3. Фосфорорганические инсектициды.....	45
1.4. Совместное использование разных групп энтомопатогенных микроорганизмов и инсектицидов.....	46
1.5. Заключение.....	48
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>50</b>
2.1. Насекомые.....	50

<b>2.2. Энтомопатогенные микроорганизмы</b> .....	51
<b>2.2.1. Бактерии</b> .....	51
<b>2.2.2. Грибы</b> .....	51
<b>2.3. Инсектициды</b> .....	51
<b>2.4. Заражение патогенами и обработка инсектицидом</b> .....	52
<b>2.4.1. Заражение энтомопатогенными грибами</b> .....	52
<b>2.4.2.Заражение энтомопатогенными бактериями</b> .....	52
<b>2.4.3.Моделирование совместного действия инсектицида и энтомопатогенов</b> .....	53
<b>2.4.4. Совместное заражение насекомых энтомопатогенными бактериями и грибами</b> .....	53
<b>2.5. Воздействие абиотических стресс-факторов на насекомых</b> .....	54
<b>2.6. Определение параметров иммунитета</b> .....	55
<b>2.6.1.Измерение интенсивности инкапсуляции</b> .....	55
<b>2.6.2.Определение активности фенолоксидаз в гемолимфе</b> .....	55
<b>2.6.3. Определение концентрации белка</b> .....	55
<b>2.7. Определение концентрации дофамина в гемолимфе насекомых</b> .....	56
<b>2.7.1. Приготовление образцов гемолимфы насекомых для определения концентрации дофамина</b> .....	56
<b>2.7.2. Измерение количества дофамина в гемолимфе насекомых</b> .....	56
<b>2.8. Статистическая обработка данных</b> .....	57

<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	58
<b>3.1.</b> Воздействие абиотических стресс-факторов на уровень дофамина в гемолимфе личинок <i>Galleria mellonella</i> и <i>Mamestra brassicae</i> .....	58
<b>3.2.</b> Уровень дофамина и активность фенолоксидаз в гемолимфе <i>Galleria mellonella</i> при инкапсуляции .....	60
<b>3.3.</b> Влияние грибной инфекции на уровень дофамина насекомых.....	64
<b>3.3.1.</b> Уровень дофамина в гемолимфе <i>Galleria mellonella</i> при заражении энтомопатогенным грибом <i>Beauveria bassiana</i> .....	64
<b>3.3.2.</b> Уровень дофамина в гемолимфе <i>Mamestra brassicae</i> при микозе, вызванном энтомопатогенным грибом <i>Beauveria bassiana</i> .....	66
<b>3.3.3.</b> Уровень дофамина в гемолимфе <i>Mamestra brassicae</i> при микозе, вызванном энтомопатогенным грибом <i>Metarhizium robertsii</i> .....	68
<b>3.3.4.</b> Уровень дофамина и активность фенолоксидаз у личинок <i>Leptinotarsa decemlineata</i> при микозе, вызванном разными штаммами гриба <i>Metarhizium robertsii</i> .....	70
<b>3.4.</b> Влияние бактериальной и смешанной бактериально-грибной инфекции на уровень дофамина насекомых.....	75
<b>3.4.1.</b> Уровень дофамина у личинок <i>Leptinotarsa decemlineata</i> при бактериозе, вызванном бактериями <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	75
<b>3.4.2.</b> Уровень дофамина и активность фенолоксидаз у личинок <i>Leptinotarsa decemlineata</i> при развитии смешанной инфекции, вызванной энтомопатогенными грибом <i>Metarhizium robertsii</i> и бактериями <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	77
<b>3.5.</b> Уровень дофамина и активность фенолоксидаз у личинок <i>Leptinotarsa decemlineata</i> при совместном воздействии энтомопатогенного гриба <i>Metarhizium robertsii</i> и пиримифос-метила.....	81

<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	87
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	90
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	91
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	92

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Универсальным и эффективным способом защиты насекомых от воздействующих на них стрессирующих факторов является нейроэндокринная стресс-реакция, во время которой происходят существенные изменения уровней гормонов различной природы, таких как биогенные амины и гонадотропины (Rauschenbach et al., 1987; Груntenко, 2008). Одним из ключевых гормонов является биогенный амин – дофамин, который играет существенную роль в таких биологических процессах как формирование кутикулы, гонадотропная регуляция, энергетический метаболизм. Среди факторов, вызывающих стрессы особо стоит выделить различные инфекционные заболевания. Патогенные микроорганизмы могут вызывать эпизоотии как в естественных экосистемах, так и в агроценозах (Raymond et al., 2010; Augustyniuk–Kram, Kram, 2012; Sujetha, Sahayaraj, 2014; Hasan, 2014). В силу того, что существует большое разнообразие энтомопатогенов, соответствующее воздействие на организм насекомого в зависимости от патогенного микроорганизма будет существенно отличаться. При инфекционном процессе происходят изменения многих физиологических реакций насекомых. В частности, в гемолимфе зараженных насекомых могут изменяться уровни гормонов стресса (Алексеев и др., 2007), выполняющих как нейрогормональные, так и иммуномодулирующие функции (Wu et al., 2015). Если учесть, что все реакции организма зависимы от гормонального статуса, то вполне закономерно, что уровни гормонов будут существенно влиять на иммунный статус организма насекомого, а также влиять на общий уровень резистентности к энтомопатогенам. Одним из наименее изученных нейрогормонов (при инфекционных процессах) остается дофамин. У насекомых дофамин является нейрогормоном, нейромедиатором и нейромодулятором. Кроме того, он участвует в формировании кутикулы (Noguchi et al., 1995; Kim et al., 2000; Theopold et al., 2004; Nappi, Christensen, 2005; Алексеев и др., 2008; Watanabe et al., 2013). Опосредованно дофамин влияет на синтез других гормонов (Jackson, Westlind-

Danielsson, 1994; Yellman et al., 1997; Pendleton et al., 2002; Богомолова и др., 2009). Кроме того, дофамин задействован в поведенческих реакциях, репродуктивной и двигательной активности *Drosophila* (Neckameyer et al., 2000, 2001; Pendleton et al., 2000, 2002; Kume et al., 2005). Было показано, что различные экологические стрессоры (Rauschenbach et al., 1993; Hirashima et al., 2000; Rauschenbach et al., 2001; Neckameyer, Weinstein, 2005), а также инфекции различной природы способны приводить к повышению уровня дофамина (Noguchi et al., 1995; Алексеев и др., 2007). Также дофамин способен регулировать половое поведение насекомых (Brandes et al., 1990; Harris, Woodring, 1995; Sasaki, Nagao, 2001; Harano et al., 2008). Показано, что дофамин способен влиять на интенсивность такой поведенческой реакции как груминг, который является одним из способов защиты насекомых от паразитов и патогенов (Libersat 2003; Libersat et al., 2009; Libersat, Gal, 2013, 2014; Currie, Stuart, 2001; Aubert, Richard, 2008; Zhukovskaya et al., 2013).

Важнейшим защитным механизмом насекомых против патогенов является профенолоксидазный (проФО) каскад, приводящий к образованию меланина (Christensen et al., 2005; Hiruma, Riddiford, 2009). При проникновении патогенов в организм насекомого происходит активация защитных механизмов, направленных на уничтожение патогенов, в частности проФО (Omelyanchuk et al., 2001; Dubovskiy et al., 2013a; Clark, 2015). Кроме того, было показано, что и на поверхности гемоцитов и внутри них есть дофадекарбоксилаза, главный фермент синтеза дофамина, а его метаболиты задействованы в процессах фагоцитоза, меланизации и инкапсуляции (Sideri et al., 2007; Marmaras, Lampropoulou, 2009). Дофамин является неотъемлемой частью проФО каскада, в процессе которого образуются меланотические тромбы, являющиеся характерной чертой течения микозов, а также образующиеся в результате механических повреждений покровов насекомого (Hajek, Leger, 1994; Tang, 2009; Andersen, 2010). Кроме того, при воздействии других энтомопатогенных микроорганизмов, таких как бактерии *Bacillus thuringiensis*, обладающих кишечной токсичностью (Bravo et al., 2011),

происходит повышение активности фагоцитоза, инкапсуляции (Dubovskiy et al., 2008), фенолоксидаз гемолимфы насекомых (Rahman et al., 2004).

Таким образом, можно сказать, что дофамин является одним из важнейших соединений, участвующих в реализации комплекса защитных реакций на действие стресс-факторов. Дофамин принимает участие как в изменении поведенческих, так и физиологических реакций при влиянии различных стресс-факторов, однако практически не изучена его роль при развитии инфекционных заболеваний насекомых. Неизвестно какой вклад вносит дофамин в функционирование меланотического каскада при стрессовых воздействиях, таких как инфекционная нагрузка. Отсутствуют сведения о его участии в процессе инкапсуляции у насекомых. Практически не изучено, какую роль он играет при острых микозах и кишечных бактериозах.

**Степень разработанности темы.** Следует отметить, что по данным направлениям исследований существует большое количество работ, посвященных детальному изучению влияния различных стрессоров на уровень гормонов и иммунный ответ организма насекомого, однако работы, в которых рассматривается влияние инфекционных агентов на гормональный уровень насекомых, единичны (Алексеев и др., 2007; Kong et al., 2013). В первую очередь это касается влияния различных бактериозов и микозов на уровень гормонов стресса, в том числе биогенных аминов, таких как дофамин. В связи с этим наша работа посвящена изучению динамики уровня таких биогенных аминов как дофамин при различных патогенезах и под влиянием абиотических факторов у представителей отрядов *Lepidoptera* и *Coleoptera*.

**Цель:** оценить изменение уровня дофамина при развитии стресс-реакции и формировании иммунного ответа у большой воцинной огневки *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), капустной совки *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) при бактериальных и грибных инфекциях, а также действии инсектицидов и абиотических факторов.

Для достижения цели нами были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить уровень дофамина у личинок *Leptinotarsa decemlineata* при заражении сублетальными и полулетальными дозами бактерий *Bacillus thuringiensis*

2. Определить уровень дофамина и активность фенолоксидаз при развитии микозов, вызванных грибами *Metarhizium robertsii* и *Beauveria bassiana* у личинок вошинной огневки, колорадского жука и капустной совки.

3. Определить уровень дофамина и активность фенолоксидаз при развитии смешанных инфекций, вызванных *Metarhizium robertsii* и *Bacillus thuringiensis*, а также при совместной обработке фосфорорганическим инсектицидом пиримифосметилом и грибом *Metarhizium robertsii* у личинок колорадского жука.

4. Проанализировать взаимосвязь между уровнем дофамина и интенсивностью инкапсуляции у личинок *Galleria mellonella*.

5. Определить уровень дофамина у личинок вошинной огневки *Galleria mellonella* и капустной совки *Mamestra brassicae* при воздействии стрессоров абиотической природы (повышенные и пониженные температуры, механические повреждения).

**Научная новизна.** Впервые показано повышение уровня дофамина у капустной совки *Mamestra brassicae* и вошинной огневки *Galleria mellonella* при воздействии стресс-факторов абиотической природы (температура, механические повреждения). Впервые выявлено, что заражение личинок большой вошинной огневки *Galleria mellonella* бактериями *Bacillus thuringiensis*, колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* и капустной совки *Mamestra brassicae* энтомопатогенными грибами *Metarhizium robertsii* и *Beauveria bassiana* приводит к увеличению уровня дофамина. Кроме того, обнаружено, что степень повышения уровня дофамина зависит от вирулентных свойств энтомопатогенного микроорганизма.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты, полученные в данной работе, могут быть использованы для дальнейшего изучения механизмов стресс-реакции у насекомых при воздействии стресс-факторов различной природы. Кроме того, данные по уровню гормонов стресса могут помочь при мониторинге состояния популяций насекомых, в том числе насекомых - вредителей сельского хозяйства, так как дофамин является своеобразным маркером стресса в популяциях насекомых.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

Энтомопатогенные микроорганизмы (грибы и бактерии) являются биотическими стресс-факторами для организма насекомого и вызывают резкие изменения уровня дофамина. Характер изменения уровня дофамина при воздействии энтомопатогенных микроорганизмов на насекомых аналогичен изменениям, наблюдающимся при воздействии абиотических факторов (температуры, механических повреждений покровов).

**Степень достоверности результатов.** Для определения достоверности результатов работы использованы современные методы подготовки образцов и анализа изучаемых параметров у насекомых. Методическая база, использованная для проведения исследований, соответствует поставленным задачам. Для статистической обработки полученного материала применены корректные статистические методы анализа. Методы, использованные для проведения исследований адекватны поставленным нами задачам.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на V Межрегиональной конференции "Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке" (Новосибирск, 2015), съезде Королевского энтомологического общества «Иммунитет насекомых» (Великобритания: Шеффилд, 2009), семинарах лаборатории патологии насекомых (ИСиЭЖ СО РАН, Новосибирск, 2014, 2015 гг.).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 6 работ в рецензируемых журналах из списка ВАК.

**Структура и объём диссертации.** Текст диссертации изложен на 127 страницах, из которых 91 страницу занимает основная часть, работа иллюстрирована 27 рисунками. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка сокращений, списка использованной литературы. Список литературы содержит 278 источников, в том числе 252 на иностранных языках.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н., профессору В.В. Глупову за руководство научной работой, поддержку и помощь при написании диссертации; к.б.н. И.М. Дубовскому за помощь при обсуждении результатов, поддержку на всех этапах работы; к.б.н. Н.А. Крюковой за ценные замечания при работе с рукописью диссертации; д.б.н. В. Ю. Крюкову за помощь при работе с рукописью. За помощь в проведении экспериментальной работы автор искренне признателен к.б.н. Ярославцевой О.Н., к.б.н. Гризановой Е.В. и другим сотрудникам лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Инфекционные заболевания насекомых, вызываемые различными патогенами, а также химические инсектициды, применяемые для защиты сельскохозяйственных культур от вредителей, являются сильнейшим стрессирующим фактором для насекомых. К наиболее распространенным патогенам насекомых в природе и используемым в защите растений, можно отнести энтомопатогенные грибы *Metarhizium*, *Beauveria* и бактерии *Bacillus thuringiensis* (Cory, Franklin, 2012). Патологический процесс, возникающий при заражении энтомопатогенными микроорганизмами, а также при воздействии инсектицидов химической природы, сопровождается развитием стресс-реакции организма, направленной на защиту насекомого от данных воздействий. На развитие патологического процесса влияют многие факторы. Во-первых, характеристики возбудителя, такие как вирулентность, патогенность и параметры действующего фактора, например, сила воздействия и доза. Во-вторых, внешние условия, определяющие проникновение патогенов или инсектицидов, а также влияющие на развитие патогенов и на течение токсикозов, вызванных химическими агентами. Третьим фактором, определяющим патогенез, является ответ организма насекомого. Свойства организма насекомого, помогающие противостоять инфекции, воздействию агентов различной природы и последующему развитию патогенеза рассмотрим далее.

### 1.1. Особенности организма насекомого

В данной главе мы остановимся на анализе лишь некоторых систем организма насекомого, которые являются мишенями для агентов биологической и химической природы. Прежде всего, таковыми являются нейроэндокринная, пищеварительная системы, внешние покровы насекомых, а также иммунная система.

### 1.1.1. Нейроэндокринная система и нейрогормоны насекомых

Взаимодействие нервной и эндокринной систем создает единый самый сложный механизм – нейроэндокринную систему, обеспечивающую осуществление всех функций организма, его приспособление в условиях изменяющейся внешней и внутренней среды. Нейроэндокринная система регулирует деятельность всех органов и систем организма насекомого. Благодаря этому обеспечивается адаптация насекомого к постоянно меняющимся условиям окружающей среды. В том числе это относится как к воздействию абиотических факторов среды на насекомых, так и к биологическим агентам, способным приводить к развитию патогенеза. К нейроэндокринным органам относятся, прежде всего, парные кардиальные тела. Синтез нейрогормонов осуществляется в нервных клетках мозга, затем они по аксонам нервного ствола поступают в секреторные терминалы, расположенные в *corpus cardiacum* (CC). Нейрогормоны могут секретироваться нервными окончаниями, другие гормоны – клетками самого CC; те и другие выводятся в гемолимфу. Еще одним органом нейроэндокринной системы являются *corpus allatum* (CA), связанные с CC (Шеперд, 1987).

Рассмотрим подробнее участие стресс-реакции насекомых в защите от биологических, химических агентов и неблагоприятных факторов среды.

Дословно с английского языка стресс переводится как напряжение. Термин "стресс" впервые появился в физике для описания давления и деформации в системе, но затем, благодаря Гансу Селье, этот термин прижился в биологических системах (Леви, 1970; Эверли, Розенфельд, 1985; Even et al., 2012). Согласно Селье (Selye, 1976), стресс – это общая неспецифическая нейрогормональная реакция организма на любое предъявленное ему требование. Эта реакция может возникать при любом воздействии различных экстремальных факторов как физических (жара, холод, травма), так и психических (опасность, конфликт, радость). В организме возникают биохимические изменения, направленные на

преодоление действия этих факторов с помощью адаптации организма к предъявленным требованиям. Факторы, вызывающие состояние стресса, Г. Селье назвал стрессорами, а совокупность изменений, происходящих в организме под действием стрессоров, - адаптационным синдромом. Выраженность изменений в организме зависит от интенсивности предъявляемых требований, от функционального состояния физиологической системы, от характера поведения животного. Стресс может быть не только вреден, но и полезен для организма (так называемый эустресс), он мобилизует его возможности, повышает устойчивость к отрицательным воздействиям (например, инфекциям), а также может приводить к облегчению течения и даже полному исчезновению заболеваний. "Вредный" стресс (так называемый дистресс) снижает сопротивляемость организма, вызывает возникновение и ухудшение течения заболеваний. Г. Селье полагал, что болезни, возникающие вследствие стресса, обусловлены либо его чрезмерной интенсивностью, либо неадекватной реакцией гормональной системы на действие стрессора. Иногда дистресс может возникать при низком уровне воздействия стрессоров (Эверли, Розенфельд, 1985). Особое значение для характера последствий (положительный или отрицательный) действия стресса на организм имеют поведенческие реакции на стрессовую ситуацию, одной из которых является активный поиск, который способствует устойчивости организма и не ведет к развитию заболеваний. При отказе от активного поиска фаза сопротивления адаптационного синдрома переходит в фазу истощения и в тяжелых случаях может привести к гибели организма. Индикатором этих типов поведения и важным механизмом их регуляции является уровень катехоламинов. Таким образом, нервная система определяет характер реагирования организма на действие стресс-факторов.

Термин "стресс" получил очень широкое распространение. Он часто применяется ко всем организмам, в частности к насекомым, когда речь идет об экстремальных воздействиях. К этим воздействиям можно отнести: неблагоприятные для развития температуры, химические (пестициды, тяжелые

металлы, метаболиты растений), физические (радиация), биологические (хищники, паразиты, патогены) факторы. Для преодоления влияний перечисленных факторов происходят быстрые и значительные изменения в физиологическом состоянии, регулируемые нейроэндокринной системой (Johnson, White, 2009).

Нейроэндокринная стресс-реакция является универсальным и эффективным способом защиты насекомых от воздействующих на них стрессоров. У насекомых стресс-реакция была определена как комплекс эндокринных реакций организма (Raushenbach et al., 1987). В стресс-реакцию насекомых вовлечены различные гормоны, в частности, биогенные амины (дофамин, октопамин, серотонин) и гонадотропины (экидистероиды и ювенильный гормон) (Грунтенко, 2008). Изучение действия этих гормонов, а также их взаимодействия является очень важным, потому что это может повлиять на разработку новых, безопасных для человека и окружающей среды методов защиты как от насекомых-вредителей сельского хозяйства, так и от насекомых, являющихся переносчиками опасных заболеваний человека.

Нейрогормоны несомненно являются основными регуляторами всех жизненных процессов у насекомых. Нейрогормоны синтезируются главным образом в нейросекреторных нейронах (НСН) мозга насекомого и в определенных периферических нейронах. Насекомые характеризуются наличием специализированных НСН, которые синтезируют нейрогормоны, впоследствии транспортируемые по аксону к нейрогемальным органам (СС и СА). Из нейрогемальных органов нейрогормоны попадают в гемолимфу (Orchard, 1982; Raabe, 1983).

Многие авторы продемонстрировали увеличение активности НСН насекомых под влиянием стрессирующего фактора. Было показано, что у насекомых секреция нейрогормонов из НСН может происходить в ответ на влияние стрессоров (Axelrod, Reisine, 1984). Были проведены многочисленные исследования по изучению влияния высоких температур, низкого качества корма,

инсектицидов, и других стрессоров на НСН мозга и нейросекреторные клетки подглоточного ганглия (Ivanović et al., 1975, 1979; Janković - Hladni et al.1983; Ivanović et al., 1985, 1989; Leković et al., 2001; Perić-Mataruga et al., 2001; Mrdaković et al., 2004; Pijjin et al., 2004; Nenadović et al., 2005, 2006). Различные стрессорные воздействия разной интенсивности вызывают определенные изменения, что в свою очередь влияет на синтез и секрецию нейросекреторного материала (НСМ) (Janković – Hladni et al. 1992). В ряде работ показано, что ответ на уровне НСН у разных видов насекомых зависит от интенсивности влияния стресс-фактора и продолжительности воздействия (Ivanović et al. 1975; Mrdaković et al. 2003).

Сигнал стрессора, полученный экстерорецепторами насекомого, передается через сенсорные нервы к мозгу. Первая стадия стресс-реакции в большой степени регулируется нейрогормонами и биогенными аминами (Davenport, Evans, 1984; Груntenко, 2008). Под их влиянием, в течение нескольких минут в жировом теле мобилизуются запасные вещества. На определенной стадии развития стресс-реакции к этой группе нейрогормонов присоединяются экдистероиды. Вторая стадия развития стресс-реакции проходит в полной зависимости от экдистероидов, синтез которых в свою очередь отрегулирован экдизиотропными нейрогормонами (экдизиотропинами). Кроме экдизиотропинов и экдизиостатинов выделение экдизонов у насекомых также может зависеть от ювенильного гормона (ЮГ). Нейрогормоны мозга насекомых, аллатотропины и аллатостатины регулируют синтез ЮГ. В некоторых случаях ЮГ стимулирует выделение экдистероидов (Perić-Mataruga et al., 2006). Далее рассмотрим гормоны, вовлеченные в стресс-реакцию насекомых, более подробно.

### *Экдистероиды*

Экдизиотропины - нейропептиды, регулирующие функционирование проторакальных желез или других клеток/тканей, отвечающих за синтез экдистероидов. Биосинтез экдистероидов в проторакальных железах или кольцевых железах у личинок насекомых стимулируется нейропептидами,

названными экдизиотропинами или проторакотропными нейрогормонами (ПТТГ) (Borovsky, 2003; Gade, Goldsworthy, 2003; Pijjin et al., 2014). Было предложено, что ПТТГ обладают множеством стресс-защитных воздействий на клетки проторакальных желез, а кроме того стимулируют синтез экдистероидов и синтез белка (Gilbert et al., 2000). Кроме того, синтез ПТТГ может меняться при возникновении стрессовых условий во время развития насекомого (Rybczynski, Gilbert, 2003). Возникновение каких стрессовых условий способно заставить мозг секретировать ПТТГ? Известно, что НСН мозга (источник ПТТГ), получают сигнал через системы рецепторов, на которых действуют различные стимулы (фотопериод, холод, высокая температура, аллелохимики растений, повреждения и т.д.) (Mizoguchi et al., 2001, 2002; Gade, Goldsworthy, 2003;). Изменения в титре ПТТГ связаны с титром экдистероидов, а также с возникновением морфологических и поведенческих изменений, которые способны стимулировать метаморфоз или стрессорный ответ (Gu et al., 2000). Кроме того, определенные изменения в сигнальной трансдукции ПТТГ могут также играть ключевую роль в контроле биосинтеза экдистероидов в проторакальных железах (Gu et al., 2000). У *Locust migratoria* (Orthoptera), *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) и *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera) изменения в растяжении кишечной стенки служат сигналом для секреции ПТТГ. Из этого следует, что внешние сигналы, включая те, которые могут быть идентифицированы как "возбуждение", могут активизировать секрецию или синтез ПТТГ (Nijhout, 1979). Прямых доказательств изменений ПТТГ под влиянием стрессоров пока нет. Известно, что секреция экдистероидов проторакальными железами регулируется непосредственно ПТТГ. Усиление секреторной функции проторакальных желез, вызванное воздействием стресс-факторов стимулирует деятельность НСН, синтезирующих ПТТГ (Dai, Mizoguchi, 1994). Следовательно, разумно рассмотреть эти наблюдения как косвенное доказательство в пользу причастности ПТТГ к ответу на стресс. Более точное свидетельство активации проторакотропной функции мозга было получено в результате микрохирургических экспериментов на гусеницах *Galleria mellonella*. В результате этих манипуляций происходила активация проторакотропной

активности мозга, вследствие которой происходила преждевременная линька. Если гусеницы *G. mellonella* в конце своей личиночной стадии были лишены свободного места для формирования кокона, проторакотропная активность мозга блокировалась сигналами внешних механорецепторов, что приводило к задержке развития. Было показано, что более серьезное повреждение вызывает секрецию ПТТГ и экдистероидов (Perić-Mataruga et al., 2006). Но такой ответ возникает не во всех случаях. У насекомых существует широкий спектр различных ответов на стрессовые воздействия. На стресс-реакцию насекомых влияют различные составляющие, в частности, физиологический статус, особенности повреждения и др. Также стоит отметить, что воздействие стресс-фактора не только оказывает влияние на стресс-реакцию организма, но и является причиной возникновения патологических процессов.

Из экдистероидов наибольшее распространение у насекомых получили 20-гидроксиэкдизон и экдизон. Наиболее полно изучено участие экдистероидов в регуляции линек, метаморфоза и репродукции (Truman, Riddiford, 2002).

Уровень синтеза этих гормонов характеризуется строгой цикличностью: в период эмбриогенеза и в межличиночный период титр экдистероидов у личинок минимален, а за несколько часов до линьки происходит повышение титра этих гормонов. У куколки экдистероиды инициируют лизис тканей и развитие зачатков из крыловых дисков, у имаго – стимулируют развитие половых желез (Truman, Riddiford, 2002).

Кроме того, экдистероиды насекомых выполняют функцию, сходную в некотором отношении с функцией глюкокортикоидов позвоночных животных. Эта функция заключается в способности индуцировать синтез определенных групп ферментов регулирующих стресс-реакцию, таких как микросомальные оксидазы (Perić – Mataruga et al. 1997). Экдистероиды изменяют метаболизм в сторону генерации мобильных форм углеводов, представляющих собой своеобразный фонд для пополнения энергии.

### *Ювенильный гормон*

Способность СА синтезировать и выделять ювенильный гормон (ЮГ) может управляться стимулирующими (аллатотропными) и угнетающими (аллатостатичными) нейропептидами, которые попадают в железы через гемолимфу или нервную систему. Из нервных тканей разных видов насекомых были выделены два аллатотропина (Tu et al., 2002; Elekonich, Horodyski, 2003). Для понимания воздействия на биосинтез ЮГ аллаторегуляторные пептиды были протестированы. В результате проведенных биотестов было идентифицировано несколько аллатотропных факторов, которые приводили к стимуляции СА (Gilbert et al., 2000; Kou, Chen, 2000; Tu et al., 2002; Elekonich, Horodyski, 2003). Аллатостатины - разнообразные по структуре пептиды, ингибирующие биосинтез ЮГ в СА многих насекомых (Hoffmann et al., 1999; Gilbert et al., 2000; Stay, 2000; Nassel, 2002). ЮГ - очень важная группа гормонов насекомых, которые регулируют развитие насекомого и участвуют в стресс-реакции. Этот гормон регулирует обмен веществ в организме насекомого, морфогенетические процессы, вителлогенез и управляет половым поведением имаго насекомых (Bellés et al., 2005). ЮГ вызывает задержку метаморфоза и контролирует (совместно с 20-гидроксиэкдизоном) диапаузу. Метаморфоз всегда проходит при пониженном титре ЮГ. Уровень синтеза ЮГ максимален на стадии личинки. Он имеет четко выраженную цикличность: увеличение титра ЮГ наблюдается в предлиночный период. Уровнем синтеза ЮГ управляет сложная система стимулирующих и ингибирующих сигналов, соотношения которых изменяются в зависимости от вида насекомого и жизненных условий. Нейросекреторный материал, содержащий аллатотропины и аллатостатины (которые обладают антагонистическими свойствами), выделяется через нервы, а также от НСН мозга в прилежащие тела. Особенностью регуляции титра ЮГ является то, что и синтез и уровень его метаболической инактивации гормона определяется специфическими ферментами (ЮГ-эстеразами и ЮГ-эпоксидгидролазами). Активность этих ферментов регулируется различными гормонами (дофамин, октопамин, 2--

гидроксиэксдизон), а также факторами среды, такими как температурный и пищевой стрессы, циркадные ритмы (Cymborowski et al., 1982; Jones, 1985; Rauschenbach, 1987, 1995). Известно, что стресс вызывает дополнительные линьки у таракана *Leucophaea maderae*, так же как у *G. mellonella* и *D. melanogaster*. Этот эффект связан с нарушением работы СА, выражающемся в поддержании высокого уровня синтеза ЮГ (Mala et al., 1987). Воздействие патогенных микроорганизмов также может изменять уровень ЮГ. Например, у гусениц *Spodoptera litura*, зараженных бакуловирусом, регистрировали аномально высокий титр ЮГ (Subrahmanyam, Ramakrishnam, 1980). Механические повреждения и неподходящая пища также вызывают аллатотропную деятельность мозга у *Lepidoptera* (Perić-Mataruga et al., 2006). Температурный шок также изменяет активность аллатотропинов и секрецию ЮГ, вызывая дополнительные личиночные линьки. Вышеперечисленные факты доказывают, что механические повреждения часто вызывают более интенсивную или более длительную секрецию аллатотропинов и ЮГ из СА. Патологические последствия этого ответа очевидны и находят выражение в различных аномалиях развития. Известно, что увеличение активности СА и высокий титр ЮГ в условиях стресса часто вызывает формирование личиночной диапаузы у некоторых видов *Lepidoptera* (Perić-Mataruga et al., 2006). Повышение титра ЮГ, вызванное стрессом, является механизмом защиты, направленным на адаптацию к действию неблагоприятных факторов (Rauschenbach et al., 2001).

#### *Адипокинетические нейrogормоны*

Адипокинетические гормоны (АКГ) проявляют широкий диапазон эффектов (Milde et al., 1995). АКГ вызывают увеличение концентрации липидов в гемолимфе саранчи *Locusta migratoria* (адипокинетический эффект) и концентрации сахаров в гемолимфе тараканов (гипертрегалозный эффект). Кардиальные тела являются главным источником этих гормонов. Было показано, что иммунореактивность АКГ также присутствует во всей центральной нервной системе насекомых (Schooneveld et al., 1983; Goldsworthy et al., 1997). Также

известно, что АКГ после стресс-факторов может стимулировать двигательную активность (Orchard et al., 1993; Socha et al., 1999;). Введение вытяжки из кардиальных тел саранчи *Locusta migratoria* вызывают гиперлипемиию (увеличение содержания липидов в гемолимфе) и изменение концентрации трегалозы в гемолимфе личинок *Morimus funereus* (Djordjević et al., 1999). Функция АКГ, главным образом, состоит в обеспечении насекомого энергией, особенно необходимой для работы мускулов крыла во время полета. При воздействии стресс-факторов снижение концентрации трегалозы в гемолимфе служит сигналом для секреции АКГ. Таким образом, метаболизм липидов тесно связан с метаболизмом углеводов, которым также управляют гормоны, секретлируемые кардиальными телами. Увеличение синтеза гликогена и повышения концентрации трегалозы в гемолимфе - обычные процессы, происходящие в ответ на воздействия стресс-факторов (Socha et al., 1999). После того, как мускулы и другие органы получили дополнительное количество липидов и трегалозы, в которых они нуждались в стрессовых условиях, расходование запасов энергии прекращается. Кроме влияния на метаболизм липидов и углеводов было установлено стимулирующее действие АКГ на мотонейроны центральной нервной системы насекомых (Milde et al., 1995). Это может иметь большое значение для запуска или поддержания поведенческих реакций.

#### *Биогенные амины насекомых*

В центральной нервной системе и позвоночных и беспозвоночных животных, биогенные амины являются важнейшими нейроактивными молекулами (рис.1). Биогенные амины способны регулировать поведение насекомых, действуя как нейрогормоны, нейромедиаторы и нейротрансмиттеры (Unoki et al., 2005; Fuchs et al., 2014). Влияя на различные жизненные процессы насекомых, такие как питание, движение, откладку яиц, репродукцию и многие другие, биогенные амины служат незаменимыми составляющими организма насекомого (Unoki et al., 2005).

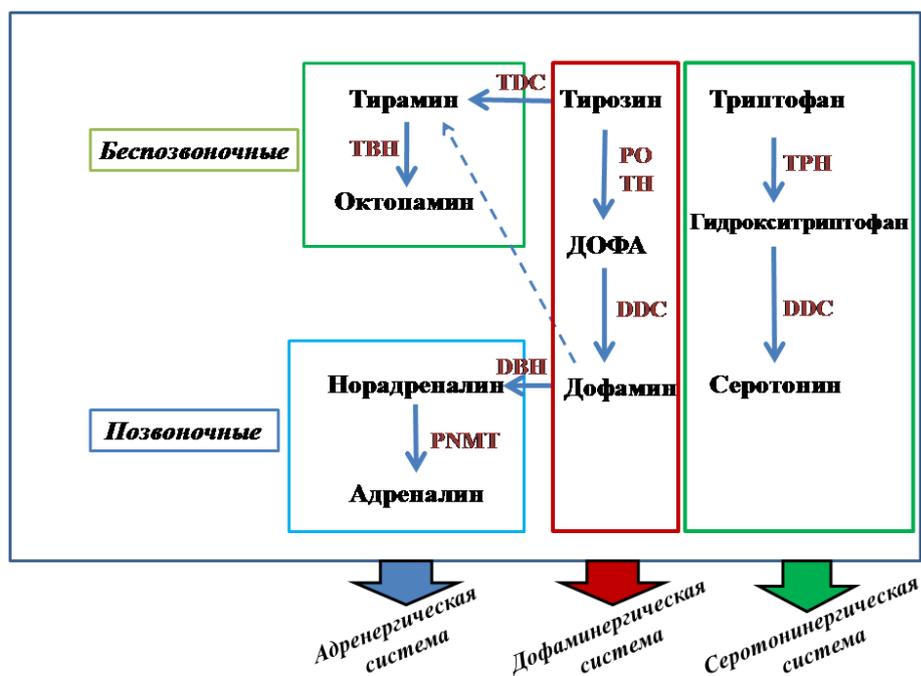


Рис. 1. Биосинтез биогенных аминов у позвоночных и беспозвоночных животных. DBH- дофамин b-гидроксилаза, DDC- дофадекарбоксилаза, PNMT- фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза, PO-фенолоксидаза, TDC- тирозиндекарбоксилаза, ТВН-тираминбетагидроксилаза, ТРН- триптофангидроксилаза (на основе статьи Fuchs et al, 2014).

Биогенные амины контролируют и регулируют различные жизненные процессы, включая циркадные ритмы, эндокринную секрецию, обучение и память (Hirashima, Eto, 1993). Они синтезируются в нейросекреторных нейронах (НСН) мозга насекомого и СС (Stevenson, Sporhase - Eichmann, 1995; Perić- Mataruga, 1997). Можно выделить следующие биогенные амины насекомых: октопамин, допамин, тирамин, гистамин, серотонин (5-гидрокситриптамин) и норадреналин. Биогенные амины насекомых, такие как допамин, тирамин, октопамин, серотонин проявляют активность, связываясь с определенными мембранными белками, принадлежащими суперсемейству G (Blenau, Baumann, 2001). Из всех биогенных аминов, найденных в организме насекомых, октопамин является одним из наиболее изученных. Его присутствие было обнаружено в нервной и нейроэндокринной системах и гемолимфе саранчовых *Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria* и многих других насекомых (Evans, 1980; Hirashima, Eto,

1993). Эксперименты, проведенные на таракане *Periplaneta americana* показали, что различные стресс-факторы вызывают увеличение уровней глюкозы (Wilson, Rounds, 1972) и трегалозы (Mathews, Downer, 1973) в гемолимфе. При этом октопамин в гемолимфе насекомых может функционировать как нейрогормон, управляя углеводным и липидным метаболизмом (Downer et al., 1984). Показано, что биогенные амины ответственны за изменения в энергетическом метаболизме насекомых при воздействии стресс-факторов (Wilson, Rounds, 1972; Davenport, Evans, 1984). Те же авторы сообщили о таком же эффекте у *P. americana* в ответ на механические и тепловые стрессоры, а также при воздействии химических инсектицидов, приводящих к увеличению концентрации биогенных аминов. Также показано, что октопамин повышает уровень фагоцитоза *in vitro* и гранулообразование *in vivo* у *P. americana* (Diehl-Jones et al., 1996). Функция октопамина насекомых как нейрогормона, подразумевает увеличение притока свободной энергии к мускулам для увеличения двигательной активности (Orchard et al., 1993). Увеличение плотности популяции у таких насекомых как *Mamestra brassicae* (Lepidoptera) и *Nauphoeta cinerea* (Blattoptera) приводит к повышению концентрации октопамина в ганглиях центральной нервной системы (Kozanek et al., 1986). В стрессовых условиях (высокая или низкая температура, механические и химические стимулы, заболевания, обездвиживание, высокая плотность популяции и т.д.) уровни дофамина и октопамина увеличиваются у разных видов насекомых (Rauschenbach et al., 1993; Perić –Mataruga, 1997; Gruntenko et al., 2000; Hirashima et al., 2000). Например, уровень дофамина и октопамина чрезвычайно быстро (уже через 10 минут после влияния стресс- фактора) увеличивается в несколько раз (Woodring et al., 1989; Hirashima, Eto, 1993). Известно, что биогенные амины играют важную роль в регулировании энергетического метаболизма у насекомых. И октопамин, и дофамин контролируют превращение гликогена в трегалозу и ее секрецию в гемолимфу. Кроме того эти биогенные амины стимулируют окисление глюкозы и трегалозы и высвобождение липидов из жирового тела (Woodring et al., 1989). Показано, что биогенные амины контролируют секрецию АКГ и других гормонов (Passier et al., 1995). Изменения

уровней биогенных аминов, вызванные неблагоприятными условиями, а также их базовый уровень (при нормальных условиях), важны для адаптации насекомых в условиях стресса (Gruntenko et al., 2004).

### *Дофамин*

Известно, что такие биогенные амины как дофамин (ДА), серотонин, октопамин играют важную роль в регуляции поведения и позвоночных и беспозвоночных животных. Являясь нейромедиаторами, нейромодуляторами и нейрогормонами, эти вещества участвуют в синаптической передаче и приводят к изменению электрической активности нейронов. Кроме того, они осуществляют модуляцию ионных каналов, синтеза белка, активности ферментов (Rojas, 2005; Sasaki et al., 2007; Farooqui, 2007).

У насекомых ДА вовлечен в различные биологические процессы: формирование кутикулы, гонадотропную регуляцию, а также в иммунный ответ (Moreira et al., 2011). ДА является жизненно важной сигнальной молекулой, обладающей двойственным характером действия. Его двойственность заключается в коммуникации между нейроэндокринной и иммунной системой насекомых. В связи с этим, ДА является не только нейромедиатором и гормоном нейроэндокринной системы, но и иммуномодулятором иммунной системы (Unoki, 2005; Zhou et al., 2011). ДА - ключевой компонент процессов кутикулярной склеротизации и меланизации (Noguchi et al., 1995; Kim et al., 2000; Theopold et al., 2004; Nappi, Christensen, 2005; Алексеев и др., 2008; Watanabe et al., 2013). Кроме того, ДА способен влиять на синтез других гормонов, таких как экдистероиды и ювенильный гормон (Jackson, Westlind-Danielsson, 1994; Yellman et al., 1997; Pendleton et al., 2002; Богомоллова и др., 2009). Было показано, что ДА способен влиять на такие поведенческие механизмы как репродуктивная и двигательная активность *Drosophila* (Neckameyer et al., 2000; Pendleton et al., 2000; Neckameyer et al., 2001; Pendleton et al., 2002; Kume et al., 2005). Экологические стресс-факторы также вызывают увеличение уровня ДА у насекомых (Hirashima et al., 2000; Neckameyer, Weinstein, 2005). Такое увеличение является

неспецифической стресс-реакцией, направленной на адаптацию насекомых к изменяющимся условиям окружающей среды (Gruntenko et al., 2004). Например, в работе Раушенбах И. Ю. с соавторами показано, что повышение уровня ДА приводит к резкому снижению активности специфических ЮГ-эстераз, что в свою очередь приводит к повышению уровня ЮГ у самок *Drosophila* во время оогенеза (Gruntenko et al., 2000). Это в свою очередь вызывает задержку откладки яиц, что позволяет насекомому приспособиться к окружающей среде и отсрочить размножение до тех пор, пока окружающая среда не станет более благоприятной (Rauchenbach et al., 1996; Gruntenko et al., 2004). Показано, что уровень ДА насекомого может изменяться от кратковременного теплового стресса, таким образом увеличение его уровня можно трактовать как стресс-реакцию на стрессовое воздействие (Rauschenbach et al., 1993; Hirashima et al., 2000; Rauschenbach et al., 2001). С экологической точки зрения этот факт очень важен, потому что индукция ДА приводит к увеличению двигательной активности. Это в свою очередь позволяет спроецировать полученные данные на поведение насекомых в природе в ответ на температурные изменения окружающей среды. Другие стрессоры, такие как инфекции различной природы, также вызывают повышение уровня ДА (Алексеев и др., 2007; Noguchi et al., 1995). Паразитарная инфекция *Anopheles gambia*, вызванная *Plasmodium falciparum* влияет на активность питания и поведение комаров, что приводит к увеличению уровня передачи инфекции (Koella et al., 1998; Andersen et al., 1999). Это доказывает способность паразитов управлять поведением их хозяев (Levri, 1999; Koella et al., 2002). Таким образом, дофамин, увеличивая двигательную активность комаров, может косвенно влиять на скорость передачи *Plasmodium falciparum*. В ряде работ показано, что ДА является одним из ключевых гормонов, регулирующих репродуктивный статус пчел (Brandes et al., 1990; Narano et al., 2008). Уровень ДА в мозге пчелиных маток намного выше, чем у рабочих пчел. Изменение репродуктивного статуса рабочих пчел (при смене матки) коррелирует с резким повышением уровня ДА в мозге (Harris, Woodring, 1995; Sasaki, Nagao, 2001).

Подводя итог всему вышесказанному, можно сказать, что дофамин в организме насекомого выполняет ряд жизненно важных функций (рис.2).

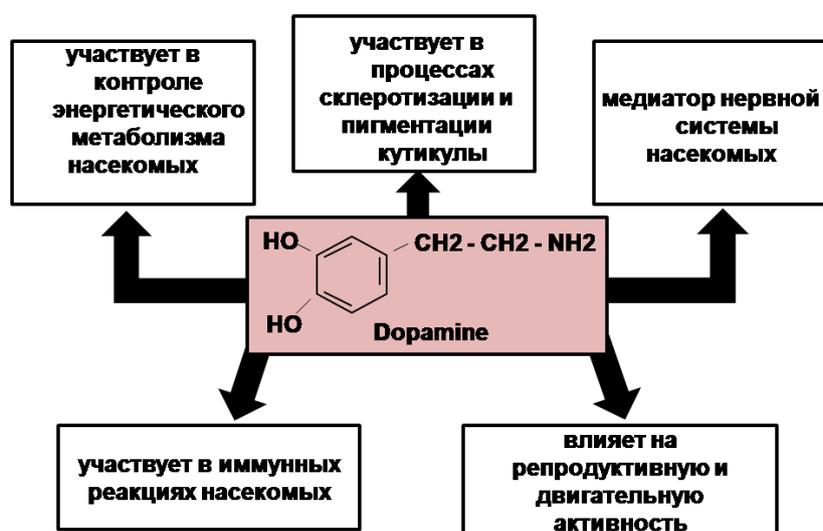


Рис. 2. Основные функции дофамина в организме насекомых.

### 1.1.2. Кутикула

Патогены способны проникать в организм насекомого через наружные покровы, эпителий трахей, кишечник. Первым защитным барьером на пути большинства патогенов является экзоскелет насекомых (Lowenberger, 2001; Tzou et al., 2002; Wilson, 2005;). Кутикула структурно и химически является барьером, препятствующим или замедляющим проникновение патогенов в гемоцель (Kavanagh, Reeves, 2004). Кутикула насекомых состоит из двух основных слоев: прокутикула и эпикутикула (Щербакова, 2008). Внутренний слой прокутикулы содержит воду в связанном состоянии и состоит из белков, связанных с хитином. Наружный слой эпикутикулы не содержит хитина (Тыщенко, 1986; Siva-Jothy et al., 2005). Он покрыт восковым слоем, содержащим липиды, жирные кислоты и стерин. Кутикула состоит из хитиновых фибрилл, встроенных в белковый матрикс (Feldhaar, Gross, 2008). В кутикуле образуются меланиновые гранулы, а за механические свойства отвечает склеротин. Они могут влиять на проникновение патогенов в организм насекомого. В первую очередь это

относится к энтомопатогенным грибам. Мощная и склеротизированная кутикула делает насекомых более устойчивыми к энтомопатогенным грибам, так как основной путь их проникновения - преодоление внешних покровов насекомого. Кроме того, существует зависимость восприимчивости насекомых к патогенам от возраста насекомого. Старшие возраста менее восприимчивы, чем младшие (James et al., 2003). Кроме того, устойчивость насекомых к патогенам в большой степени зависит от свойств эпикутикулы, так как первым этапом проникновения гриба является адгезия конидий на поверхности насекомого (Ment et al., 2010).

Повреждение кутикулы активирует иммунный ответ, в результате чего происходит подавление или полная элиминация патогена (Hajek, St. Leger, 1994).

### **1.1.3. Пищеварительная система**

Ввиду того, что внутри кишечника созданы благоприятные условия для развития инфекции, круг патогенов, способных проникать через эпителий кишечника намного шире, чем патогенов, способных преодолеть кутикулярный барьер. К таким патогенам относятся бактерии, жгутиконосцы, грегарины, кокцидии и т.д. Наличие хитиновой интимы, выстилающей передний отдел кишечника, является прочным барьером на пути проникающих патогенов (Kuraishi et al., 2011). В связи с этим, основное число патогенов проникает внутрь насекомого через средний кишечник, лишенный такой выстилки (Глулов и др., 2001). Несмотря на отсутствие хитина в среднем кишечнике, не менее важное значение в функционировании этого отдела имеет перитрофическая мембрана (перитрофический матрикс, ПМ). Впервые ПМ насекомых был описан Е. Бальбиани в 1890 году как "мембраноподобный мешок, окружающий пищу в полости желудка" (Глулов и др., 2001; Григорьева, Амосова, 2004). У одного и того же насекомого при прохождении разных стадий жизненного цикла форма ПМ может меняться. Некоторые ПМ представлены постоянно, в то время как другие вызваны приемом пищи. Примером может служить появление ПМ у самок комаров после приема порции крови (Tellam, 1996; Kato et al., 2006). ПМ состоит из белков, гликопротеинов и хитиновых микрофибрил, погруженных в

протеогликановый матрикс. Такой состав позволяет считать ПМ механическим барьером, защищающим клетки эпителия от повреждений и возбудителей инфекции (Shi et al., 2004; Plymale et al., 2008;). Также показано участие ПМ в детоксикации токсинов энтомопатогенов, свободных радикалов и аллелохемиков растительного происхождения. Было показано, что танины связываются ПМ и полностью выводятся из организма *Schistocerca gregaria*, что позволяет избежать негативного влияния этих соединений на организм насекомого (Bernays, Chamberlain, 1980; Bernays, 1981). Различные ферменты, вырабатываемые в кишечнике также способны выполнять роль своеобразного барьера, разрушая клетки микроорганизмов и их метаболиты (Zdybicka-Varabas et al., 2012). Кроме того, эпителиальные клетки кишечника способны продуцировать ряд антимикробных пептидов, оказывающих губительное действие на бактериальные и грибные микроорганизмы (Wojda, Jakubowicz, 2007; Mak et al., 2010). Известны также работы, в которых показано, что гормоны, вырабатываемые клетками кишечника, влияют на развитие паразитов и болезнетворных организмов, переносчиками которых являются насекомые (Sehnal, Zitiian, 1996). Огромное влияние на развитие патогенов различной природы оказывает кишечная флора. Представители флоры кишечника насекомых либо непосредственно проявляют антагонистическое действие на микроорганизмы, либо способны разрушать токсины бактерий, синтезируя ферменты (Глупов и др., 2001).

Важное значение в процессе пищеварения играет антиперистальтика кишечника. При антиперистальтических движениях пищевая масса продвигается в обратном направлении. Антиперистальтические движения служат в основном для перемешивания пищи во время ее переваривания (Lehane, 1997). Кроме того, возвращение пищи из задней кишки в среднюю имеет важное функциональное значение. Примером может служить пищеварение термитов: переваривание клетчатки у них осуществляется симбиотическими простейшими, которые находятся в задней кишке. Благодаря антиперистальтике у термитов

переваривание клетчатки происходит в задней кишке, а всасывание в средней (Тыщенко, 1986).

Таким образом, можно сказать, что кишечник является надежным барьером на пути проникновения патогенов. Благодаря выработке антибактериальных, фунгицидных белков, ферментов и компонентов антиоксидантной системы становится возможным эффективное сдерживание и подавление инфекции.

#### **1.1.4. Иммунная система**

Иммунный ответ делят на клеточный и гуморальный. Однако, данное разделение условно, в связи с тем, что эти реакции тесно взаимосвязаны. Прежде всего, такое разделение служит для удобства понимания. Мы также будем придерживаться этого условного разделения.

##### **1.1.4.1. Клеточный иммунитет**

###### *Фагоцитоз*

Фагоцитоз - эволюционно сохранившийся процесс, присущий всем эукариотам (Yutin et al. 2009). Процесс фагоцитоза присущ как гемоцитам насекомых, так лейкоцитам млекопитающих (Berger, Jurčová, 2012). Участие в фагоцитозе у насекомых в большинстве случаев принимают плазматочиты и гранулоциты (Kedra, Bogus, 2006; Giglio et al., 2008; Brivio et al., 2010). Фагоцитоз является первым механизмом защиты насекомого от проникающих в гемоцель патогенов. Фагоцитозу подвергаются объекты, не превышающие размера самих гемоцитов. Могут фагоцитироваться также различные инертные частицы, такие как латексные шарики и частицы туши.

Фагоцитоз это многоступенчатый процесс, состоящий из нескольких стадий: распознавания, прикрепления, формирования псевдоподий, поглощения чужеродного объекта и формирования фагосомы (Gillespie et al., 1997; Stuart,

Ezekowitz, 2008). Необходимым условием прохождения процесса фагоцитоза является наличие ионов кальция (Kryukova et al., 2013).

Первый этап - хемотаксис и распознавание чужеродного объекта является важнейшим для формирования иммунного ответа. Этот этап происходит благодаря взаимодействию паттерн-распознающих рецепторов на поверхности гемоцитов с различными составляющими клеточных стенок патогенов, такими как  $\beta$ -1,3 гликаны, липополисахариды и пептидогликаны. К паттерн-распознающим рецепторам относят иммуноглобулин-подобные белки, интегрины, коллагены, пероксинектины и ламинины, агглютинины, LPS-связывающие белки,  $\beta$ -1,3 гликан связывающие белки (Johansson, 1999; Gupta, 2001a; Lavine, Strand, 2002, 2003; Brivio et al., 2010).

После распознавания патогена/объекта происходит перестройка цитоскелета гемоцита, образование псевдоподий, поглощение чужеродного объекта и формирование фагосомы. Затем внутри фагосомы происходит разрушение захваченного объекта с помощью гидролитических ферментов, а также активированных кислородных метаболитов и оксида азота (Ratcliffe, 1985; Semenova et al., 2014).

### *Инкапсуляция и гранулообразование*

Одними из основных механизмов клеточного иммунного ответа являются грануло- и капсулообразование. Образование гранул может происходить когда необходима элиминация небольших объектов при их большом количестве (латекс, бактерии). В этом случае происходит группировка большого количества гемоцитов, элиминирующих значительное количество чужеродных объектов (Nappi et al., 2009; Rosales, 2011). Вначале гемоциты окружают их, формируя совместно с ними агрегаты, которые постепенно увеличиваются за счет дополнительного присоединения гемоцитов. Образование гранулы завершается после формирования плотно прилегающих слоев гемоцитов вокруг чужеродных объектов. В большинстве случаев образовавшиеся гранулы меланизируются, что

позволяет эффективно изолировать проникший объект (Nappi et al., 2009; Rosales, 2011).

Формирование капсулы происходит в том случае, если чужеродный объект значительно превышает размеры гемоцитов (простейшие, яйца и личинки паразитоидов, нематоды). В процессе инкапсуляции, как правило, участвуют два типа гемоцитов: плазматоциты и гранулоциты (Ratcliffe, Gagen, 1977; Kavanagh, Reeves, 2004).

Гемоциты формируют капсулу вокруг чужеродного объекта, образуя много слоев клеток. Затем капсула, как правило, меланизируется, а инкапсулированный организм погибает от цитотоксических продуктов или асфиксии (Lavine, Strand, 2002; Feldhaar, Gross, 2008; Rosales, 2011). Капсула образуется в течение 2 - 24 часов, но полностью завершённой её можно считать лишь через 72 часа. В результате, в центре капсулы находится чужеродный объект, окруженный разрушенными гранулоцитами, эумеланином и белками. Средний слой состоит из частично разрушенных сильно уплощенных плазматоцитов, а внешний слой составляют свободно прикрепленные плазматоциты (Lavine, Strand, 2002).

Сформированные капсулы и гранулы выполняют не только роль механического барьера, препятствующего дальнейшему развитию патогена, но и способны ограничивать распространение патогена в организме хозяина благодаря содержащимся внутри капсулы свободнорадикальным соединениям, образующиеся в процессе меланизации (Глулов и др., 2001; Глулов и др., 2009).

#### **1.1.4.2. Гуморальный иммунитет**

##### *Коагуляция*

В случае нарушения целостности покровов насекомого наступает опасность потери гемолимфы, а также проникновения патогенных микроорганизмов в полость тела. Для предотвращения этих последствий активируется процесс коагуляции, направленный на "запечатывание раны" (Theopold et al., 2002).

Процесс коагуляции наиболее хорошо изучен у мечехвостов *Limulus polyphemus* L. и *Tachypleus tridentatus*. У этих видов процесс коагуляции представляет собой взаимодействие двух составляющих: системы коагуляции и каскада, активирующего профенолоксидазу. Каскад, активирующий проФО включает в себя распознавание микроорганизмов с помощью специализированных паттерн-распознающих белков и последующую активацию трех сериновых протеаз, приводящую к образованию из неактивной проФО активной фенолоксидазы (ФО) (Iwanaga et al., 1998; Li et al., 2002). В процессе коагуляции также принимают участие коагулирующий белок коагулоген, преобразующийся в коагулин и клеточные компоненты – гранулоциты (Gupta, 2001b). У насекомых найдено два вида коагулогенов: плазменный - синтезируемый жировым телом и клеточный - гемоцитин, содержащийся в гранулах гранулоцитов (Barwig, Bohn, 1980).

После запуска процесса коагуляции в гранулоцитах происходит формирование вакуолей, радиальное расширение цитоплазматических пузырьков, набухание ядер и выброс цитоплазматического и ядерного материала из клеток. Затем плазменный и гемоцитарный коагулогены формируют перекрестно-связанный сгусток. Необходимыми компонентами процесса коагуляции у насекомых являются ионы кальция и активный Н-фактор, который секретируется гемоцитами. Они также необходимы для активации фенолоксидазы. В результате происходит лизис гранулоцитов и активация сериновых протеаз, следствием чего является запуск фенолоксидазного каскада (Gupta, 2001b; Kryukova et al., 2013).

#### *Антимикробные пептиды и белки*

В ответ на воздействие патогенов организм насекомых способен секретировать различные антимикробные пептиды и белки.

В большинстве своем антимикробные пептиды/белки представляют собой молекулы небольшого размера, проявляющие широкий спектр активности, направленной против бактерий и грибов. Синтез антимикробных пептидов - признак высших отрядов насекомых с полным превращением: *Lepidoptera*,

*Diptera*, *Hymenoptera* и *Coleoptera* и некоторых видов с неполным превращением, относящихся к отряду *Hemiptera*. Процесс синтеза антимикробных пептидов по видимому отсутствует у многих древних насекомых, относящихся к прямокрылым и тараканообразным, у которых преобладают такие защитные механизмы как фагоцитоз и инкапсуляция (Hoffman et al., 1996). Синтез этих соединений происходит в основном в клетках жирового тела, но также они могут синтезироваться клетками гемолимфы и перикардальными клетками (Глулов и др., 2001; Kurata, 2006). Было показано, что такие антимикробные белки как лизоцим и дефензины также могут синтезироваться клетками кишечника и слюнных желез. У некоторых насекомых антимикробные белки способны синтезироваться клетками половых путей самцов и самок (Hoffman et al., 1996). Насекомые способны синтезировать уникальный набор антимикробных пептидов, обладающих специфичностью к определенным группам микроорганизмов (грамположительные, грамотрицательные бактерии и грибы).

Механизм действия антимикробных пептидов и белков различен. Некоторые антибактериальные белки, например лизоцим, гидролизуют гликозидную связь между N-ацетилглюкозамином и N-ацетил-мурамовой кислотой, входящими в состав бактериальных клеток. Дефензины и цекропины блокируют генерацию АТФ (Bulet et al., 1999; Глулов и др., 2001). Цекропины выделены из чешуекрылых и двукрылых насекомых и проявляют активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Дефензины широко распространены среди насекомых и действуют только на грамположительные бактерии (Hoffmann, 1995).

#### *Профенолоксидазная система*

Одним из важнейших механизмов защиты беспозвоночных, а в частности насекомых, является меланизация патогенов и поврежденных тканей. Процесс меланизации контролируется особым ферментом – фенолоксидазой (ФО). Фенолоксидаза – это медьсодержащий фермент, относящийся к классу оксиредуктаз. В организме насекомых фенолоксидаза локализована в кутикуле,

гемолимфе в виде неактивных проферментов (Глулов и др., 2001). Активация ФО у насекомых происходит под воздействием ферментативного каскада – профенолоксидазного каскада. Запуск этого каскада происходит в ответ на различные факторы, в частности на проникновение патогенов. Происходит активация сериновых протеаз, которые действуют на профенолоксидазу. Активация сериновых протеаз происходит при повреждении кутикулы, контакте гемолимфы с чужеродными агентами, при взаимодействии с компонентами клеточных стенок микроорганизмов. После активации ФО принимает участие в образовании меланина (Söderhäll, Cerenius, 1998; Глулов и др., 2001; Satyavathi et al., 2014). Роль фенолоксидазы в меланогенезе состоит в преобразовании фенолов до хинонов, которые впоследствии полимеризуются и формируют меланин. (González-Santoyo, Cordoba-Aguilar, 2012). По своей структуре меланин является индолил-хиноном. Меланин - сложный полимер, обладающий высокой механической устойчивостью (Söderhall, Ajaxon, 1982). Образование меланина - это сложный, многоэтапный процесс, который начинается с активации ФО. Под действием ФО происходит гидрокселирование тирозина в дигидроксифенилаланин (ДОФА) (рис. 3). Затем ДОФА окисляется до ДОФА-хинона также под действием ФО. Следующим этапом в образовании меланина является внутримолекулярная циклизация и индолизация ДОФА-хинона в формы лейко-ДОФА-хрома, ДОФА-хрома, 5,6-дигидрооксииндола и индолил – 5,6 – хинона и эумеланина. Из ДОФА-хрома в присутствии двухвалентных ионов металлов образуется 5,6-дигидрооксииндол-2-уксусная кислота. Далее под действием пероксидаз и ФО индолы окисляются до хинонов с последующей полимеризацией и образованием эумеланина. Кроме того, в случае включения в данный каскад реакций дофадекарбоксилазы, из ДОФА может образовываться дофамин, являющийся предшественником дигидрооксииндола и эумеланина. Дофамин может ацетелироваться N-ацетилтрансферазой, в результате чего образуется N-ацетилдофамин, переходящий в N-ацетилдофаминхинон, который полимеризуется с образованием склеротина (Глулов и др., 2001).



насекомого, а отсутствие его ингибиторов влечет за собой опасность меланизации всей гемолимфы, необходимо контролировать активацию и активность ФО. Благодаря тому, что ФО в организме насекомого находится в виде профермента, этот контроль частично осуществляется ингибиторами сериновых протеиназ (Cerenius, Soderhall, 2004). Примером таких ингибиторов может служить гетеродимерный белок с уникальной структурой, выделенный из речного рака *Pacifastacus leniusculus*. Кроме обеспечения пигментации, меланин также вовлечен в три важных физиологических процесса: иммунные реакции, заживление ран и склеротизацию кутикулы (Sugumaran, 2002).

При инкапсуляции и меланизации происходит не только заживление раны, нанесенной проникшим объектом, но и прекращение роста и распространения патогена. Данные механизмы защиты не только помогают насекомому в репарационных процессах, но и способствуют элиминации патогенов благодаря продукции токсичных промежуточных звеньев меланизации - активированных кислородных метаболитов (Nappi, Ottaviani, 2000 ).

#### **1.1.4.3. Детоксицирующая система**

Работа детоксицирующей системы насекомых направлена на преобразование эндогенных и экзогенных токсичных веществ в менее ядовитые (Li et al., 2007). Несомненно, к таким веществам относятся химические инсектициды. Реакции детоксикации подразделяются на Фазу 1 и Фазу 2. Данная классификация основана на способе действия на токсичные вещества. Реакции Фазы 1 включают окислительные, восстановительные и гидролитические реакции. Реакции фазы 2 – это процессы ферментативной конъюгации, в результате которой образуются конъюгаты с продуктами фазы 1. При этом, как правило, происходит существенное снижение токсичности и повышение гидрофильности, после чего эти метаболиты выводятся из организма (Mamidala et al., 2011). У насекомых описано 3 основные группы ферментов, участвующих в инактивации токсических веществ: цитохром P450-зависимые монооксигеназы (участвуют в окислительных

реакциях Фазы 1), эстеразы (участвуют в гидролизе Фазы 1), глутатион-S-трансферазы (ГСТ) (участвуют в реакциях Фазы 2) (Mamidala et al., 2011).

Ферменты детоксицирующей системы играют огромную роль в формировании устойчивости к химическим инсектицидам, а также в иммунных реакциях насекомых (Perry et al., 1998; Mamidala et al., 2011).

## 1.2. Энтомопатогенные микроорганизмы

### 1.2.1. Энтомопатогенные бактерии *Bacillusthuringiensis*

Бактерии *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) относятся к семейству *Bacillaceae* и роду *Bacillus*. Это аэробные или факультативно-анаэробные грамположительные бактерии, в конце вегетативного роста образующие споры. *Bt* - наиболее распространенный вид энтомопатогенных бактерий, широко используемый в качестве препаратов для биологического контроля растительноядных и кровососущих насекомых. В отличие от других видов рода *Bacillus* эта бактерия образует кристаллы. Впервые она была выделена Луи Пастером из гусениц тутового шелкопряда в конце 19 века, а идентифицирована Берлинером в 1911 году (Кандыбин, 1989; Ohba, 2011)

Бактерии *Bacillus thuringiensis* отличаются от других родственных видов формированием кристаллических параспоральных включений (дельта-эндотоксинов) в течение споруляции (Logan, 2012). Токсичность отдельных штаммов *Bt* обусловлена активностью этих токсинов. Кристаллические эндотоксины образуются одновременно со спорой и имеют белковую природу. Они нерастворимы в воде ( $\text{pH} \leq 9$ ) и органических растворителях, для их растворения требуется щелочная среда.

Дельта-эндотоксины разделяются на 2 основные группы: Cry (кристаллический) и Cyt (цитолитические) (Pietrantonio, Gill, 1996; Székács, Darvas, 2012). На сегодняшний день известно более 120 различных типов Cry белков и еще больше их разновидностей, хотя изначально Cry белки

классифицировали в соответствии с их специфичностью по отношению к отрядам насекомых: CryI – против *Lepidoptera*, CryII – против *Diptera*, CryIII – против *Coleoptera*. Позднее эта классификация была признана непригодной. Новая классификация базируется на гомологии последовательностей аминокислот. Все CryI белки по новой классификации также проявляют активность преимущественно против *Lepidoptera*, а CryIII белки - против *Coleoptera* (Maagd, 2015).

Патогенность *Bt* в значительной степени обусловлена кишечной токсичностью Cry-токсинов. Было показано, что кристалл может содержать один или несколько Cry токсинов (Schnepf et al., 1998). Во время споруляции *Bt* синтезирует кристаллы нескольких морфотипов, форма которых зависит от составляющих их протоксинов. Морфотипы кристаллов, в большинстве случаев найденные в окружающей среде, имеют следующие формы: бипирамидальную (ромбоидальную), сферическую (круглую), кубовидную/прямоугольную и неправильную. Бипирамидальные кристаллы содержат протоксины Cry1, квадратные - Cry2, прямоугольные - Cry3A, сферические Cry4A и Cry4B, ромбовидные Cry11A, кристаллы неправильной формы Cry3B (Schnepf et al., 1998; Wasano et al., 2000; Shisa et al., 2006). Было показано, что бактерии, производящие бипирамидальные кристаллы, встречаются как в почве, так и на поверхности листьев. Реже встречаются кристаллы сферические и неправильной формы (Bernhard et al., 1997; Hansen et al., 1998; Maduell et al., 2002; Armengol et al., 2007).

#### *Механизм действия на организм насекомого*

Энтомоцидность бактерии *Bt* обусловлена ее способностью продуцировать в течение жизнедеятельности и спорообразования ряд токсинов и других метаболитов. А. Хемпел в 1967 году классифицировал токсины *Bt*:  $\alpha$ -экзотоксин,  $\beta$ -экзотоксин,  $\gamma$ -экзотоксин,  $\delta$ -эндотоксин. Кроме того, инсектицидное действие *Bt* также связано с некоторыми другими продуктами вегетативной клетки и споры, такими как VIP белки (Vegetative Insecticidal Proteins) (Ohba, 2011). При попадании

в кишечник насекомого происходит активация токсина в результате его ограниченного протеолиза. Первый этап: растворение кристалла *Vt* в кишечнике насекомого, зависящее от pH. Кристаллы  $\delta$ -эндотоксина растворяются в щелочной среде кишечника насекомого. Активация токсина сопровождается образованием нескольких активных единиц - Cту-токсинов. В ряде случаев может образовываться только Cту-токсин в зависимости от состава токсина.

Активированный токсин легко проникает через перитрофическую мембрану благодаря своему низкому молекулярному весу 60-70 kDa. Затем происходит связывание токсина с рецептором на поверхности эпителиальной клетки. Такими рецепторами могут быть аминопептидаза N и щелочная фосфатаза, а также кадеринподобный рецептор и металопроотеиназа ADAM (Zhang, Lovgren, 1995; Pietrantonio, Gill, 1996). После связывания токсина с рецепторами происходит внедрение его доменов в мембрану эпителиальной клетки. Анализ Cту-токсина выявил наличие у него трех доменов: домен I состоит из семи альфа-спиралей, домен II состоит из антипараллельных бета-структур, которые заканчиваются выступающими петлями, домен III - сэндвич из двух бета-структур (Бурцева и др, 2001).

В результате действия токсина образуются литические поры и ионные каналы, что неизбежно ведет к притоку воды и ионов в клетку. Клетки эпителия набухают и становятся рыхлыми. В первую очередь поражаются столбчатые клетки. В стенках столбчатых и бокаловидных клеток образуются трещины, клетки сморщиваются, а затем разрываются в апикальной области. Содержимое кишечника попадает в гемолимфу, меняется pH гемолимфы. Бактерии из кишечника проникают в гемолимфу, где усиленно размножаются, вызывая септицемию. Пораженные насекомые становятся вялыми, малоподвижными, прекращают питаться, у некоторых начинается рвота, понос, замедляется рост и развитие. Насекомые, получившие летальную дозу патогена, гибнут через разные сроки - от 2 до 15 суток в зависимости от дозы и восприимчивости особи (Кандыбин, 1989; Бурцева и др., 2001).

### 1.2.2. Энтомопатогенные грибы *Metarhizium robertsii* и *Beauveria bassiana*

Энтомопатогенные грибы широко распространены в наземных экосистемах и вызывают энзоотии и эпизоотии в популяциях насекомых. В мире насчитывается более 2000 видов энтомопаразитических грибов среди которых ведущее место по числу представителей занимает отдел *Ascomycota*. Многие виды грибов активно изучаются и используются во многих странах мира для регуляции численности насекомых вредителей. Их несомненное преимущество перед другими агентами биологического контроля состоит в том, что данные патогены обладают контактным действием, что позволяет использовать их против сосущих и почвенных вредителей. Также можно успешно применять препараты на основе энтомопатогенных грибов в закрытом грунте, где условия для развития грибов наиболее благоприятны. Наиболее широко и успешно для производства биопрепаратов против насекомых-фитофагов используются грибы преимущественно из двух родов: *Metarhizium* (сем. Clavicipitaceae s.s) и *Beauveria* (сем. Cordycipitaceae), относящихся к порядку *Hyphocreales*, отдела *Ascomycota*.

#### *Основные особенности биологии грибов*

Энтомопатогенные грибы *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., Rehner&Humber (ранее *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin и *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. являются космополитами, встречаясь в различных экосистемах от умеренных до тропических и экваториальных поясов. Данные грибы предпочитают лесные и луговые биоценозы и могут встречаться в агроценозах (Meyling, Eilenberg, 2007). Оптимальными для развития гриба *Metarhizium robertsii* является температура 28-30°C, а лимиты роста для большинства культур 8 и 38°C (Штейнхауз, 1952; Vidochka et al., 2001). Температура около 50°C губительна для гриба: пятиминутное выдерживание при данной температуре убивает большинство конидий, также губительно влияют на споры солнечные лучи (Вейзер, 1972 ). *M. robertsii* поражает насекомых самых разных отрядов, а также клещей.

Оптимальной для развития гриба *Beauveria bassiana* (*B. bassiana*) является температура 20-26°C. Температурные лимиты роста для *B. bassiana* 5 и 36°C. Этот патоген поражает самые разные отряды насекомых-хозяев: *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Coleoptera*, *Diptera*, *Orthoptera* и др. (Lopez-Perez et al., 2014). Пораженные насекомые покрываются белым мучнистым или ватообразным мицелием. Заражению подвержены насекомые почти на всех фазах развития. К числу хозяев *B. bassiana* относятся такие экономически значимые виды как озимая совка *Agriotis segetum*, луговой мотылек *Loxostege sticticalis*, кукурузный мотылек *Ostrinia nubilalis*, вредная черепашка *Eurygaster integriceps*, колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata*, белокрылки (Штерншис и др., 2004).

Жизненный цикл энтомопатогенных грибов *M. robertsii* и *B. bassiana* состоит из 3 основных стадий (Vega et al., 2009).

1. Биотрофная стадия. Включает в себя прикрепление конидий к внешним покровам насекомого, последующее проникновение в полость тела с постепенной колонизацией 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 следующего поколения конидий.

3. Покоящаяся стадия. После завершения нектротрофной стадии конидии попадают во внешнюю среду, где гриб способен сохраняться до следующего контакта с хозяином. Кроме того согласно последним исследованиям эти грибы способны развиваться в ризосфере и внутренних тканях растений (Ownley et al., 2010; Behie et al., 2012, 2015).

*Пути проникновения грибов в организм насекомых и их дальнейшее развитие  
в полости тела хозяев*

Заражение насекомых энтомопатогенными аскомицетами происходит различными путями. Проникновение грибов возможно через наружные покровы, поровые канальца в кутикуле, склериты, межсегментные участки, кишечник, а также через дыхальца или половое отверстие (Вейзер, 1972; Борисов и др., 2001; Butt et al., 2013).

В самом начале происходит образование гидрофобных связей между кутикулярными липидами и клеточной оболочкой гриба, в результате чего происходит закрепление спор (Goettel, 1988). Также важную роль в закреплении патогена на поверхности насекомого играют микроворсинки, щетинки, неровности и выросты кутикулы (Борисов и др., 2001). После закрепления спор гриба на насекомом, происходит их развитие на поверхности покровов (рис. 4). На этом этапе большое значение имеет высокая относительная влажность, необходимая для прорастания споры и дальнейшего развития гриба. Спора прорастает ростковой трубкой, а в месте соприкосновения с кутикулой начинается образование апрессория. Апрессорий по своей сути представляет своеобразную совокупность физической силы и литических ферментов, значительно упрощающую проникновение патогена внутрь насекомого (Hajek, Leger 1994; Valero-Jiménez et al., 2014). После этого апрессорий делится.

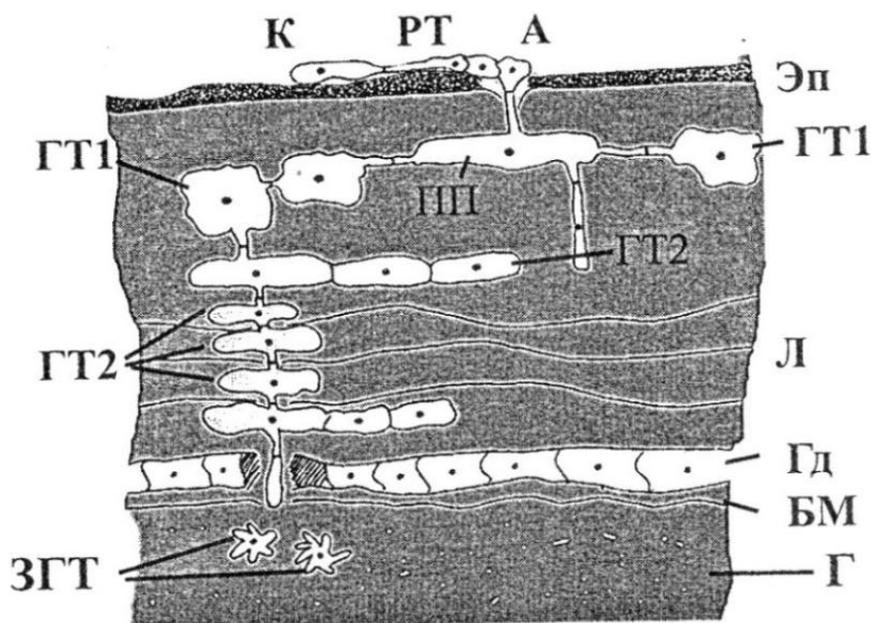


Рис. 4. Процесс инфицирования личинок шелкунов энтомопатогенным грибом *Metarhizim anisopliae* (по Hajek, St.Leger, 1994, цит. по Борисов и др., 2001). Эп – эпикутикула; Гд – гиподерма; БМ – базальная мембрана; Л – ламеллы прокутикулы; Г – гемолимфа; К – конидия; РТ – ростковая трубка; А – апрессорий; ПП – проникающая плата; ГТ1 и ГТ2 – гифальные тела первого и второго порядка; ЗГТ – звездообразные гифальные тела в гемолимфе.

Для дальнейшего проникновения через более глубокие слои кутикулы энтомопатогенные грибы синтезируют ряд ферментов. Под действием ферментов в эпикутикуле формируются полости, в которые проникает прорастающая из апрессория трубка. После достижения прокутикулы проникающая трубка разрастается параллельно ламеллам, образуя проникающую плату, из которой ответвляются отростки – гифальные тела. Из гидролитических ферментов в литературе в основном описаны липазы, протеазы и хитиназы (Fan et al., 2007; Khachatourians, Qazi, 2008). В начале происходит деградация кутикулярных белков под воздействием протеаз, в результате чего происходит высвобождение хитина. Параллельно происходит индукция активности хитобиаз и хитозаназ гриба, которые гидролизуют хитин до N-ацетилглюкозамина. Далее происходит индукция активности хитиназ гриба, что приводит к усилению «гидролитической атаки» со стороны патогена и перфорации экзокутикулы благодаря воздействию

гиф гриба. Далее, уже в эндокутикуле, богатой липидами, происходит активация липаз гриба (Борисов и др., 2001). 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 попадает в гемоцель насекомого. В гемоцеле происходит его дальнейшее развитие и колонизация внутренних органов, в гемолимфе образуются гифальные тела и 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 при достаточно высокой влажности (90-100%) грибные гифы начинают расти в обратном направлении - к поверхности тела хозяина. Затем гифы прорывают кутикулярные покровы и выходят на поверхность, образуя конидии (Борисов и др., 2001). Огромный вклад в развитие патогенов, вызываемых энтомопатогенными грибами, вносят вырабатываемые ими токсины. Наиболее хорошо изучены и описаны токсины грибов *Beauveria*, *Metarhizium*, *Aspergillus*, *Penicillium*. Самыми распространенными являются токсины циклопептидной природы. Кроме того, энтомопатогенные грибы продуцируют ферменты, в частности *B. bassiana* вырабатывает протеазы, являющиеся необходимым компонентом инфекционного процесса (Bidochka, Khachatourians, 1987, 1988, 1990; Огарков, Огаркова, 2000; Fang et al., 2005). Также гриб *B. bassiana* может продуцировать другие токсины, в частности бассианин, бассиакридин, бассианолид, боверолиды, тенеллин и ооспореин. Некоторые токсины грибов кроме инсектицидной активности обладают антигрибковым и антибиотическим действием, в частности ооспореин (Roy et al., 2008). Наиболее интенсивно изучаемыми в настоящее время являются деструксины - токсины, впервые выделенные из грибов рода *Metarhizium*. В настоящее время насчитывается около 38 деструксинов или их аналогов (Roberts, Leger, 2004). Деструксины А, В и Е обладают выраженным инсектицидным действием (Cavelier et al., 1998; Thomsen, Eilenberg, 2000). У насекомых при инъекциях деструксинов возникает паралич

или тремор (Samuels et al., 1988; Bradfish, Harmer, 1990). Кроме того, деструксины обладают иммуносупрессивным действием путем подавления процессов клеточного иммунитета за счет цитотоксического действия (Vilcinskas et al., 1997; Vilcinskas, Matha, 1997).

### **1.3. Фосфорорганические инсектициды**

Фосфорорганические инсектициды (ФОС) благодаря своей высокой инсектицидной активности, а также такому важнейшему свойству как быстрая деградация на нетоксичные компоненты, широко используются в сельскохозяйственном производстве. В настоящее время создан довольно широкий круг ФОС. Препараты отличаются друг от друга нормами расхода, кратностью обработок, сроками обработок и другими характеристиками, но обладают сходным механизмом действия (Мохамед и др., 2009). Использование ФОС неизбежно ведет к возникновению устойчивости к применяемому препарату (Galloway, Handy, 2003; Буров и др., 1999). Кроме того, ФОС, обладая низкой избирательностью действия, являются токсичными для нецелевых насекомых и человека (Задорожный, Суторихин, 2005).

#### *Механизм действия*

Токсическое действие ФОС на насекомых основано на фосфорилировании жизненно важных соединений, в том числе фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в нервной системе. За счет фосфорилирования данный фермент инактивируется, что приводит к нарушению биохимического цикла обмена ацетилхолина (АХ). В результате, в синапсах накапливается избыток АХ, который не разрушается как обычно, а продолжает воздействовать на холинорецепторы, что приводит к гиперактивности, нарушению деятельности различных органов и в целом к общему отравлению организма (Pore, 1999; Попова, 2009).

При обработке ФОС у насекомых наблюдается гиперактивация, тремор конечностей, а затем паралич. При действии летальных доз гибель насекомого наступает уже через несколько часов после контакта с пестицидом. К наиболее быстро разлагающимся и малотоксичным ФОС относятся препараты на основе пиримифос-метила. Они относятся к контактно-кишечным пестицидам с глубинным эффектом (Попова, 2009).

#### **1.4. Совместное использование разных групп энтомопатогенных микроорганизмов и инсектицидов**

Разработка эффективных мер борьбы с вредителями в некоторых случаях приобретает важнейшее значение. Вспышки массового размножения вредителей наносят огромный экономический и хозяйственный ущерб. В связи с этим возникает необходимость быстрого и экологически безопасного способа подавления численности вредителей.

Химические инсектициды способны в кратчайшие сроки эффективно снижать численность насекомых, но, как было сказано выше, эти средства борьбы имеют ряд существенных недостатков, ограничивающих возможность их применения. Кроме того, использование биологических агентов контроля численности насекомых, несмотря на экологичность их применения тоже не всегда возможно, так как препараты на основе энтомопатогенных микроорганизмов проявляют нестабильность действия и обладают длительным латентным периодом, в течение которого насекомое успевает нанести существенный ущерб растению (Крюков и др., 2007). В связи с этим все большую популярность приобретает комбинированное применение разных видов энтомопатогенов, а также совместное использование энтомопатогенов и химических инсектицидов. Используются смеси как близких микроорганизмов, например разных видов энтомопатогенных грибов, так и систематически далеких – энтомопатогенных грибов и бактерий (Крюков и др., 2009). Применение подобных комбинированных препаратов позволяет добиться синергического и

аддитивного эффекта. Синергический эффект был показан при заражении сенегальской кобылки *Oedaleus senegalensis* энтомопатогенными микроорганизмами: микроспоридией *Paranosema locustae* и энтомопатогенным грибом *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Tounou et al., 2008). Кроме того, были проведены исследования по совместному применению энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* и нематоды *Steinernema feltiae*, которые также показали синергизм и высокую эффективность против личинок вошинной огневки *Galleria mellonella* (Staves, Knell, 2010). Синергический эффект был выявлен при совместном применении энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* и энтомопатогенной нематоды *Heterorhabditis bacteriophora* против черного виноградного долгоносика *Otiiorhynchus sulcatus*. (Ansari et al., 2008). Аддитивный эффект был показан при совместном использовании энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* и энтомопатогенной нематоды *Steinernema kraussei* против черного виноградного долгоносика *Otiiorhynchus sulcatus* (Ansari et al., 2010). Синергический эффект был показан при совместном применении энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* и энтомопатогенных бактерии *Bacillus thuringiensis* против колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Wraight, Ramos, 2005).

Значительное влияние на исход заболевания оказывают вирулентные свойства самого патогена. Группой авторов были проанализированы два штамма энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* с разными жизненными стратегиями: токсигенной (Р-72) и биотрофной (МАК-1) (Крюков и др., 2011). Было показано, что конидии штамма Р-72 более интенсивно прорастают на кутикуле насекомых по сравнению с менее вирулентным штаммом МАК-1. Кроме того, штамм Р-72 дает слабое дочернее спороношение, но более высокие темпы гибели насекомых, что связано с его высоким уровнем токсинообразования. Однако до сих пор практически не изучены защитные реакции, а также изменения гормонального статуса насекомых при инфицировании штаммами с разными жизненными стратегиями.

Широкое распространение получили грибные препараты в комбинации с инсектицидами химической природы (Furlong, Groden, 2001; Purwar, Sachan, 2006; Dubovskiy et al., 2010). Было показано, что совместное применение энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* с сублетальными дозами неоникотиноидов и фенилпиразолов позволяют эффективно подавлять численность черного виноградного долгоносика *Otiiorhynchus sulcatus* (Shah et al., 2007). С помощью подобных смесей удается не только добиться повышения биологической эффективности и сокращения латентного периода микоинсектицидов, но также снизить дозы инсектицидов химической природы. Эффективность этих препаратов неоспорима, но недостаточно хорошо изучены механизмы, с помощью которых достигается синергический эффект и то как воздействие данных препаратов может влиять на гормональный статус насекомого.

### 1.5. Заключение

Нейроэндокринная стресс-реакция - универсальный и эффективных способ защиты организма насекомого от негативного действия различных стресс-факторов биотического и абиотического происхождения. В нейроэндокринной стресс-реакции насекомых участвуют биогенные амины (дофамин, октопамин, серотонин) и гонадотропины (экдистероиды и ювенильный гормон). Нейрогормоны участвуют в регуляции всех жизненно важных процессов у насекомых. В центральной нервной системе как позвоночных, так и беспозвоночных животных, биогенные амины являются одними из важнейших нейроактивных молекул, способных влиять на различные жизненные процессы насекомых, такие как питание, движение, откладку яиц, репродукцию и многие другие. Отдельно стоит выделить дофамин. Дофамин, с одной стороны, является ключевым компонентом процессов кутикулярной склеротизации и меланизации, с другой стороны как нейрогормон он способен влиять на синтез экдистероидов и ювенильного гормона, а также на ряд поведенческих реакций, таких как агрессию,

репродуктивную и двигательную активность. Увеличение уровня дофамина может происходить при воздействии стресс-факторов различной природы.

При воздействии стресс-факторов различной природы помимо нейроэндокринного комплекса включается ряд других защитных систем организма. Первым барьером на пути энтомопатогенов является кутикула насекомых, способная препятствовать или замедлять проникновение энтомопатогена в полость тела хозяина. Содержащиеся в кутикуле меланин и склеротин могут влиять на проникновение и развитие патогена в организме насекомого. В случае преодоления кутикулярного барьера энтомопатогенными микроорганизмами в гемоцеле запускается ряд других защитных механизмов, направленных на элиминацию патогена. Прежде всего это реакции клеточного и гуморального иммунитета, а также детоксицирующая система. Все эти системы взаимосвязаны, а если учесть, что многие реакции организма зависят от гормонального статуса организма можно с уверенностью сказать, что уровень и состав гормонов будут существенно менять иммунный статус организма насекомого при воздействии стрессоров как биотической, так и абиотической природы.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Насекомые

Исследования проводились на трех видах насекомых: большой вошинной огневке *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera:Pyralidae), капустной совке *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera:Noctuidae), колорадском жуке *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae).

Личинки большой вошинной огневки были взяты из лабораторной популяции ИСИЭЖ СО РАН. Насекомых содержали при температуре 28°C в темноте. В качестве корма использовали питательную среду Вейзера (кукурузная крупа 22%, пшеничная крупа 11%, пшеничная мука 11%, сухое молоко 11%, сухие дрожжи 5,5%, воск 17,5%, мед 11%). Имаго содержали на сахарном или медовом сиропе (5%).

Личинки колорадского жука были собраны в Новосибирской области в июле-августе, на полях, свободных от обработок инсектицидными препаратами. Личинок содержали в лабораторных условиях при 25°C в вентилируемых пластиковых контейнерах (57×39×42 см), смена корма (листья картофеля *Solanum tuberosum*L.) проводилась ежесуточно.

Яйца капустной совки были собраны в июне на полях капусты белокочанной ООО СХП «Агрос». Личинок первого поколения содержали при 25°C в вентилируемых контейнерах. Смена корма (листья капусты брокколи *Brassica silvestris*) производилась ежедневно. В работе использовали личинок II поколения, полученных в лабораторных условиях.

Для работы использовали личинок III и V-VI возраста большой пчелиной огневки, IV возраста колорадского жука и V возраста капустной совки.

## 2.2. Энтомопатогенные микроорганизмы

Для моделирования патогенезов были использованы энтомопатогенные бактерии и грибы.

### 2.2.1. Бактерии

Для заражения колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* использовали бактерии *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* (H8 ab) Bonnifoi and de Barjak var. *tenebrionis* Krieg et al., (штамм 2495) из коллекции микроорганизмов ИСиЭЖ СО РАН. Данный штамм изолирован из погибшей личинки большого мучного хрущака *Tenebrio mollitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) лабораторной популяции ИСиЭЖ СО РАН

### 2.2.2. Грибы

Для исследований использовались штаммы энтомопатогенных грибов *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., Rehner & Humber из коллекции ИСиЭЖ СО РАН (штамм Р-72) и Всероссийского института защиты растений РАСХН (штамм МАК-1). Штамм Р-72 изолирован в 1972 г. из погибших личинок колорадского жука *L. decemlineata* в Латвии (Serebrov et al., 2007). Штамм МАК-1 выделен в 2000 г. на юге Новосибирской области (НСО) из погибших особей итальянского пруса *Calliptamus italicus* L. (Orthoptera: Acrididae). Также для заражения насекомых мы использовали энтомопатогенный гриб *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. штамм САР-31, выделенный на юге НСО в окрестностях г. Карасук в 2001 году.

## 2.3. Инсектициды

Для обработки насекомых использовали действующее вещество (д.в.) пиримифос-метил, относящееся к группе фосфорорганических инсектицидов.

## 2.4. Заражение патогенами и обработка инсектицидом

### 2.4.1. Заражение энтомопатогенными грибами

Конидии грибов суспендировали в дистиллированной воде (с добавлением Твина-20, 0.03%). Насекомых обрабатывали перкутанно, погружая в водную суспензию на 10 сек. Контрольную группу насекомых обрабатывали дистиллированной водой (с добавлением Твина-20, 0.03%). В ряде экспериментов погибших насекомых раскладывали в стерильные чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу для установления количества особей, на которых формируется дочернее спороношение грибов. При заражении личинок *G. mellonella* энтомопатогенным грибом *B. bassiana* использовали 2 титра:  $10^6$  и  $10^8$  конидий/мл). Приготовление образцов гемолимфы для измерения концентрации дофамина производили на 1, 3, 5 сутки после заражения. При заражении личинок *M. brassicae* грибом *B. bassiana* использовали ( $10^5$  конидий/мл и  $10^8$  конидий/мл). Приготовление образцов гемолимфы для измерения концентрации дофамина производили на 1, 2, 3 сутки после заражения. Для заражения личинок *M. brassicae* грибом *M. robertsii* использовали шт. Р-72 ( $10^5$  конидий/мл и  $10^8$  конидий/мл). Приготовление образцов гемолимфы для измерения концентрации дофамина производили на 1, 2 и 3 сутки после заражения. В дополнительных экспериментах личинок *L. decemlineata* заражали разными штаммами энтомопатогенного гриба *M. robertsii*. При заражении штаммом МАК-1 и штаммом Р-72 использовали титр  $4 \times 10^6$  конидий/мл. Приготовление образцов гемолимфы для измерения концентрации дофамина производили на 1, 2 и 3 сутки после заражения.

### 2.4.2. Заражение энтомопатогенными бактериями

Для инфицирования насекомых бактериями проводили обработку корма. Для инфицирования личинок *L. decemlineata* побеги и листья картофеля обрабатывали суспензией содержащей споро-кристаллическую смесь бактерий (титр  $5 \times 10^8$  спор и кристаллов/мл и титр  $2 \times 10^9$  спор и кристаллов/мл) ручным опрыскивателем до

появления стекающих капель, с последующим высушиванием в течение 20 минут при 25°C. Личинки *L. decemlineata* питались на листьях, обработанных бактериями, в течение 2-х суток. Затем в качестве корма использовали необработанные листья картофеля. В контрольных вариантах растения обрабатывали дистиллированной водой. Приготовление образцов гемолимфы для измерения концентрации дофамина производили на 1, 2 и 3 сутки после заражения.

#### **2.4.3. Моделирование совместного действия инсектицида и энтомопатогенов**

Обработку насекомых инсектицидом проводили топикально. 1 мкл раствора пиримифос-метила в концентрации 0.0025% 0,1 ДК наносили на дорзальную поверхность личинки *L. decemlineata*. На насекомых из контрольного варианта наносили по 1 мкл дистиллированной воды. Учет смертности во всех экспериментах проводился ежедневно. Заражение личинок *L. decemlineata* энтомопатогенным грибом *M. robertsii* шт. P-72 титр  $10^6$  конидий/мл проводили по вышеуказанной методике. Моделирование совместного воздействия энтомопатогенного гриба *M. robertsii* и пиримифос-метила проводили следующим образом: часть насекомых обрабатывали перкутанно энтомопатогенным грибом *M. robertsii* шт. P-72 (титр  $10^6$  конидий/мл), а через 12 часов этих же насекомых обрабатывали топикально раствором пиримифос-метила в концентрации 0.0025%, что составляет 0,1 ДК (пороговой дозы, вызывающей признаки интоксикации). Другую группу насекомых обрабатывали топикально раствором пиримифос-метила в указанной концентрации, а затем через 12 часов этих же насекомых обрабатывали перкутанно энтомопатогенным грибом *M. robertsii* (титр  $10^6$  конидий/мл). Приготовление образцов гемолимфы для измерения концентрации дофамина производили через 12 и 48 часов после заражения.

#### **2.4.4. Совместное заражение насекомых энтомопатогенными бактериями и грибами**

Совместное заражение насекомых энтомопатогенными бактериями и грибами проводили на личинках колорадского жука *L. decemlineata* по вышеуказанным

методикам. В варианте с совместным заражением и энтомопатогенными грибами и бактериями сначала проводили обработку энтомопатогенным грибом *M. robertsii* шт. P-72, а затем они подсаживались на корм, обработанный энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* var. *tenebrionis* штамм 2495. Титры при заражении: *M. robertsii*- $2 \times 10^6$  конидий/мл, *B. thuringiensis*- $2,5 \times 10^7$  спор и кристаллов/мл. Приготовление образцов гемолимфы для измерения концентрации дофаминов производили на 1, 2 и 3 сутки после заражения.

## 2.5. Воздействие абиотических стресс-факторов на насекомых

Для моделирования стресса, вызванного абиотическими факторами, использовали 3 модели воздействия на насекомых: перегрев, переохлаждение, ожог. Данные модели мы применили к личинкам вошинной огневки *Galleria mellonella* и капустной совки *Mamestra brassicae*. Для моделирования воздействия высоких температур (перегрева) личинок 5 возраста вошинной огневки и капустной совки помещали в термостат с 50 °C на 2 минуты. По прошествии времени личинок извлекали, а через 10 минут производили забор гемолимфы по указанной ниже методике. Для создания условий, при которых наступает переохлаждение, личинок помещали в морозильную камеру (-18 °C), где они находились 5 минут. После этого насекомых извлекали из морозильной камеры и через 10 минут производили отбор гемолимфы. Для моделирования ожога над спиртовкой нагревали иглу, которой прикасались к 4 вентральному сегменту тела личинок вошинной огневки и капустной совки. Через 10 минут после воздействия производили отбор гемолимфы. Подготовленные образцы анализировали на хроматографе.

## **2.6. Определение параметров иммунитета**

### **2.6.1.Измерение интенсивности инкапсуляции**

Интенсивность процессов инкапсуляции у насекомых оценивали по степени потемнения нейлоновых имплантантов длиной 2 мм и диаметром 0.5 мм. Имплантанты вводили под кутикулу личинок *G. mellonella* с вентральной стороны. Через 15 минут, 30 минут, 1 час, 4 часа и 24 часа имплантанты извлекали, фотографировали и измеряли степень потемнения капсулы с помощью программы Image J (Rantala, Roff, 2006; Dubovskiy et al., 2008, 2011).

### **2.6.2.Определение активности фенолоксидаз в гемолимфе**

Активность фенолоксидаз у личинок вошинной огневки и колорадского жука определяли, используя метод Ashida и Söderhäll (1984) с модификациями. Отбор гемолимфы проводили индивидуально, выделяя 5 мкл гемолимфы в 20 мкл охлажденного 10 мМ фосфатного буфера pH 7.2 (ФБ), содержащего 1мМ ингибитора протеаз фенилметилсульфонил фторид (ФМСФ). 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 490нм. 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., 2008).

### **2.6.3. Определение концентрации белка**

Концентрацию белка в образцах гемолимфы насекомых определяли по методу М. Бредфорд (Bradford, 1976). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

## **2.7. Определение уровня дофамина в гемолимфе насекомых**

### **2.7.1. Приготовление образцов гемолимфы насекомых для определения уровня дофамина**

Образцы гемолимфы колорадского жука, вошинной огневки и капустной совки отбирали в 0.2 М HClO<sub>4</sub>. Для приготовления 1 образца гемолимфы личинок колорадского жука отбирали гемолимфу от 3 личинок, от каждой по 16,6 мкл. У личинок капустной совки для приготовления 1 образца использовали гемолимфу от 1 личинки объемом 50 мкл. У личинок вошинной огневки для приготовления образца отбирали гемолимфу от 5 личинок объемом по 10 мкл от каждой. Гемолимфу смешивали хлорной кислотой в соотношении 1:1, затем инкубировали в термощейкере Biosan TS 100 при 28°C и 600 rpm 10 минут. После этого образцы инкубировались при комнатной температуре 20 минут. Затем образцы центрифугировали при 4°C в течение 10 минут при 10000g. Надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку и центрифугировали еще раз 5 минут при 10000g. Перед загрузкой образца в прибор проводилась его фильтрация.

### **2.7.2. Измерение количества дофамина в гемолимфе насекомых**

Содержание дофамина в гемолимфе измеряли методом внешнего стандарта на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity с электрохимическим детектором EsaCoulchemIII (модель ячейки 5010A; потенциал ячейки 300mV) по методу Грунтенко с соавторами (Gruntenko et al., 2005) с модификациями. В качестве стандарта использовали Dopamine hydrochloride (Sigma-Aldrich). Разделение проводили на колонке ZorbaxSB-C18 (4,6мм ×250 мм, частицы 5 мкм) в изократическом режиме. Подвижная фаза: 90% буфера (200 мг/л 1-OctaneSulfonicAcid (Sigma-Aldrich), 3,5 г/л KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) и 10% ацетонитрила. Скорость потока 1 мл/мин. Обработка хроматограммы проводилась с помощью ПО ChemStation, количество дофамина определяли сравнением площадей пиков стандарта и образца.

## 2.8. Статистическая обработка данных

Данные представлены как среднее арифметическое и его ошибка. Данные были проверены на нормальность распределения при помощи теста Д'Агостино (D'Agostino & Pearson omnibus normality test) и критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk normality test). Для 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). Статистическую значимость различий изучаемых параметров для данных с ненормальным распределением определяли с помощью теста Мана-Уитни (Mann-Whitney U-test) и однофакторного дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана (Kruskal-Wallis test with Dunn's test). Сравнение динамики смертности насекомых при заражении энтомопатогенными бактериями и грибами и обработке инсектицидами проводили с использованием метода Каплана Майера с последующим Log-Rank тестом. Для анализа использованы программы Statistica 6.0, GraphPad Prism v.4.0. (GraphPad Software, USA), Sigma Stat 3.1.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Воздействие абиотических стресс-факторов на уровень дофамина в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* и *Mamestra brassicae*

Для моделирования абиотического стресса мы использовали три вида воздействия: перегрев, переохлаждение, ожог. Было показано, что при перегреве уровни ДА повышаются примерно в 7 и 3,5 раза у личинок капустной совки *M. brassicae* и вошинной огневки *G. mellonella* соответственно (различия достоверны рис. 5, 6) У капустной совки мы также отмечено достоверное увеличение уровня дофамина в гемолимфе по отношению к контролю в варианте с ожогом в 5,5 раз (рис. 5). При воздействии пониженной температуры уровень ДА не изменялся (рис.5, 6).

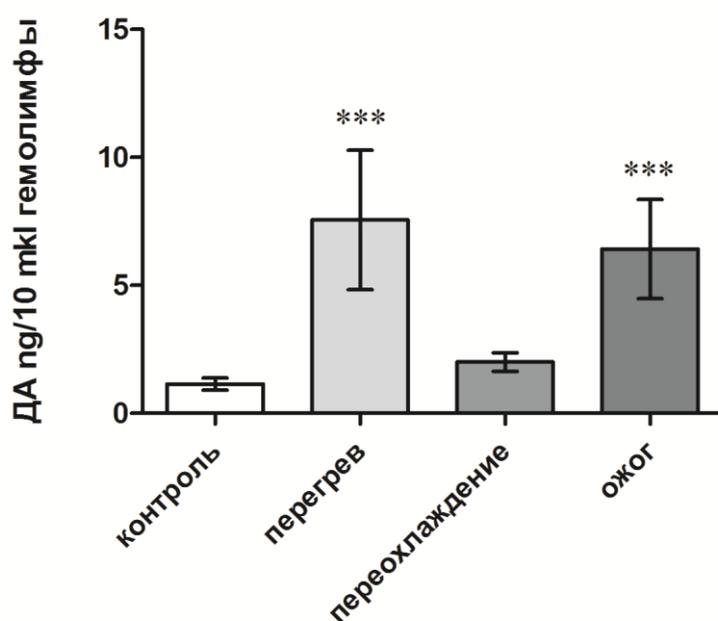


Рис.5. Уровень дофамина в гемолимфе личинок *M. brassicae* при воздействии абиотических стресс-факторов; \*\*\* $p < 0.001$  по сравнению с контролем;  $n=15$  на вариант.

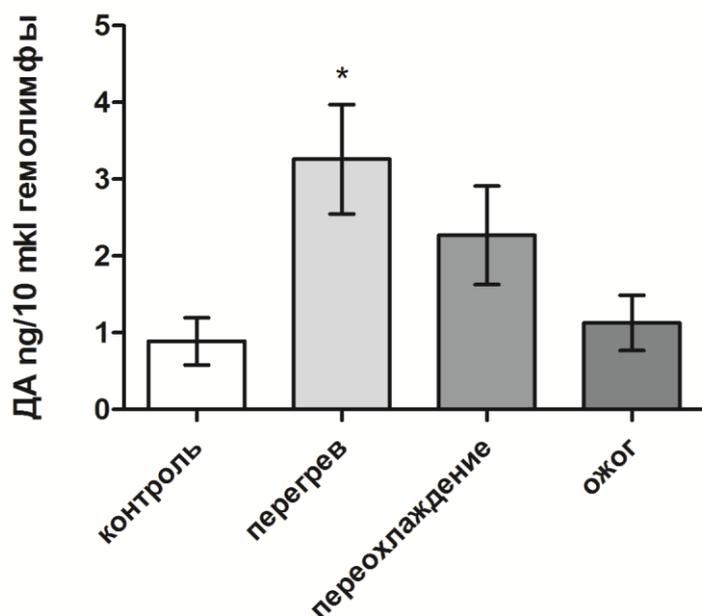


Рис.6. Уровень дофамина в гемолимфе личинок *G. mellonella* при воздействии абиотических стресс-факторов; \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем;  $n = 50$  на вариант.

Аналогичные результаты были получены другими исследователями (Hirashima et al., 2000; Rauschenbach et al., 1993; Chentsova et al., 2002). Так, при изучении влияния абиотических стрессоров на содержание ДА у имаго *Drosophila virilis*, было установлено, что через 15 минут после повышения температуры до  $38^{\circ}\text{C}$  содержание ДА резко увеличивается. Кроме того, было показано, что уровень дофамина достоверно увеличивается при механическом встряхивании имаго *Drosophila virilis* (Rauschenbach et al., 1993; Hirashima et al., 2000).

Исследования проведенные на имаго медоносной пчелы *Apis mellifera*, показали снижение уровня биогенных аминов, в том числе ДА при охлаждении (охлаждение на льду в течение 1 и 3 минут), повышенной концентрации  $\text{CO}_2$  и вращении насекомых на центрифуге при разных скоростях (Chen et al., 2008). Это противоречит нашим данным и данным, полученным Раушенбах с соавторами. Вероятно, это связано с тем, в этой работе определяли уровень ДА в мозге, а не в гемолимфе насекомых. Кроме того, отсутствие повышения уровня дофамина при воздействии на насекомых отрицательных температур, вероятно, связано с

замедлением всех метаболических процессов у насекомых, подвергшихся этому воздействию. Полученные нами данные свидетельствуют о сильнейшем стрессе, который испытывают насекомые при воздействии высоких температур и механических повреждений. В результате воздействия повышенной температуры и ожога происходит выброс дофамина, по-видимому, направленный на комплекс реакций, позволяющих насекомым перенести созданные неблагоприятные условия. При таком сильном воздействии дофамин может выполнять несколько функций - с одной стороны, он секретируется в гемолимфу личинок как нейрогормон и его действие связано с изменением локомоторной активности, с другой стороны, при механическом повреждении покровов (в данном случае это ожог) происходит формирование меланотического пятна в месте ожога, а, как известно, дофамин является важным звеном меланогенеза.

### **3.2. Уровень дофамина и активность фенолоксидаз в гемолимфе *Galleria mellonella* при инкапсуляции**

Инкапсуляция один из важнейших защитных механизмов насекомых, направленных на элиминацию чужеродных агентов (Rosales, 2011). В этих экспериментах в качестве чужеродного агента были использованы нейлоновые имплантанты.

Интенсивность меланизации нейлонового имплантанта у нативных личинок *G. mellonella* достоверно увеличивалась в пределах 4 часов. В дальнейшем она не изменялась (рис.7).

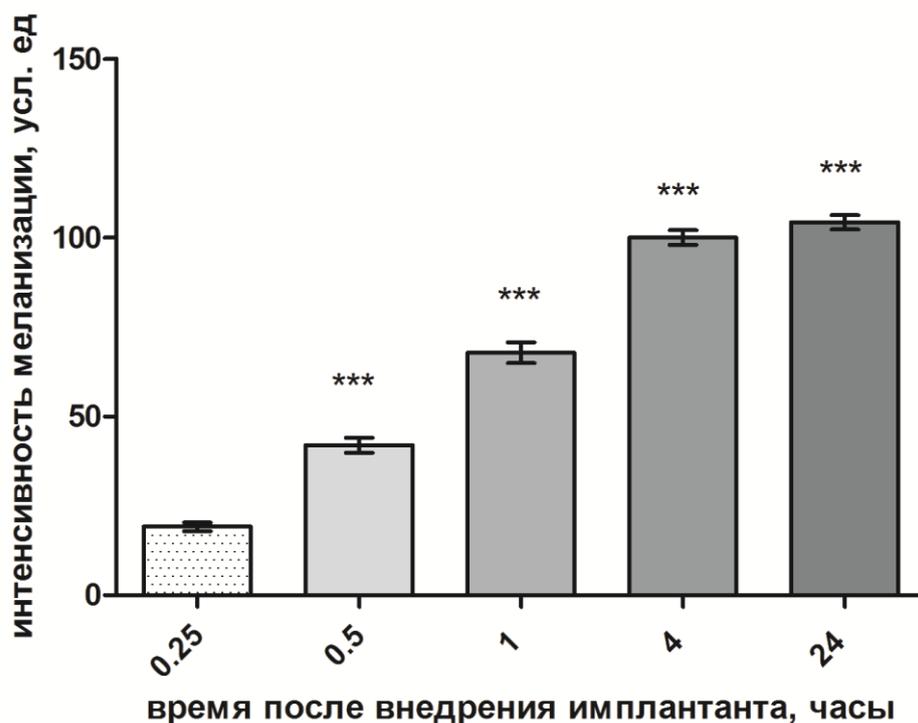


Рис. 7. Интенсивность меланизации нейлонового имплантата у личинок *G. mellonella*; \*\*\* $p < 0.001$  по сравнению с вариантом 15 мин;  $n = 50$  на вариант.

Кроме того, при инкапсуляции проводилось измерение активности фенолоксидаз гемолимфы личинок *G. mellonella*. Активность фенолоксидаз в гемолимфе достоверно ( $p < 0.001$ ) отличалась от контроля в 2,5 раза через 4 часа после внедрения имплантата (рис.8).

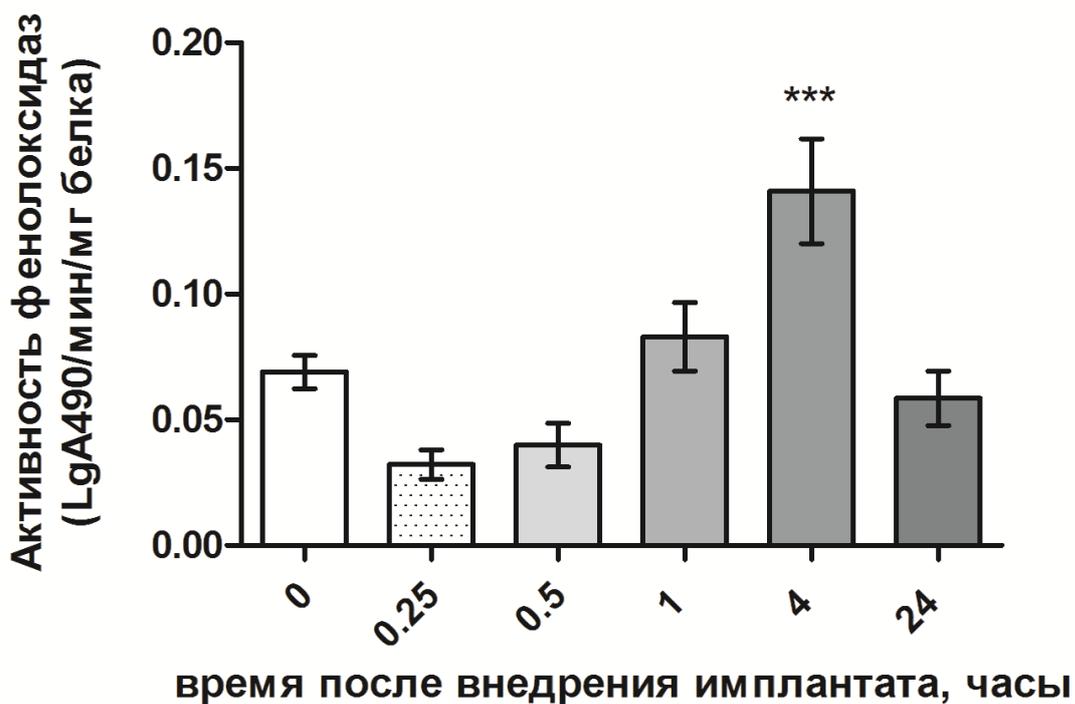


Рис.8. Активность фенолоксидаз в гемолимфе *G. mellonella* при введении нейлонового имплантата; \*\*\* $p < 0.001$  по сравнению с контролем;  $n=20$  на вариант.

Уровень дофамина при внедрении нейлонового имплантата у личинок *G. mellonella* достоверно повышался по отношению к контролю через 24 часа после внедрения (в 2,5 раза) (рис.9).

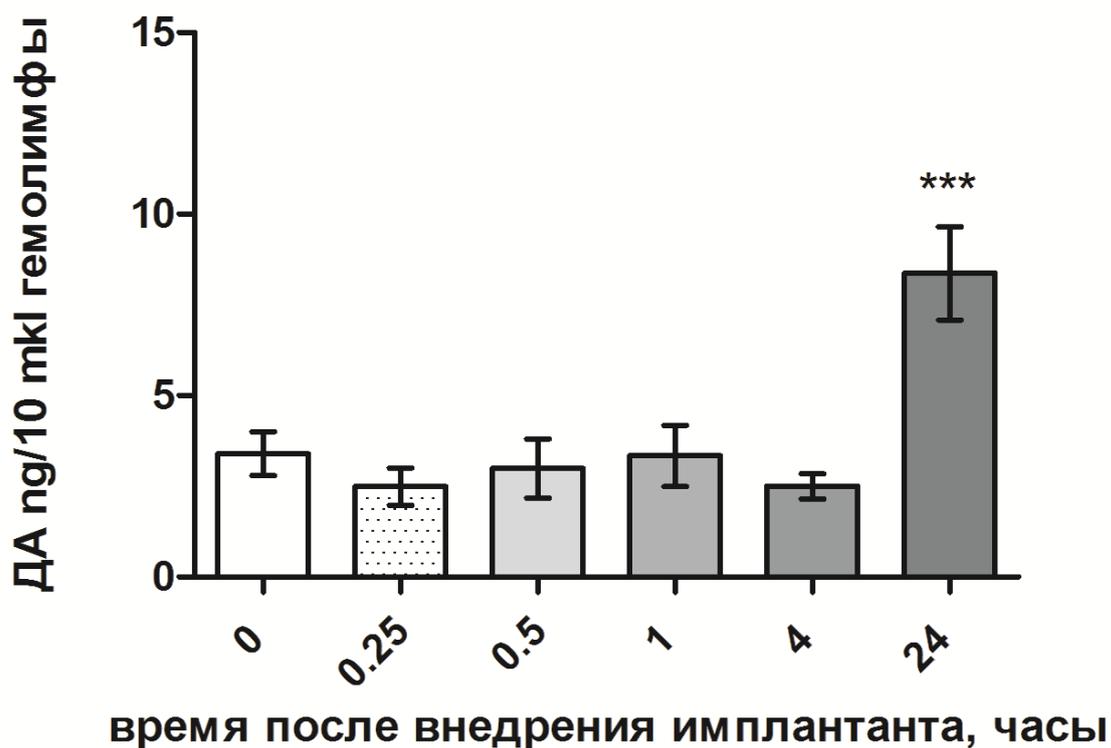


Рис.9. Уровень дофамина в гемолимфе личинок *G. mellonella* при введении нейлонового имплантанта; \*\*\* $p < 0.001$  по сравнению с другими вариантами;  $n=50$  на вариант.

Формирование меланизированной капсулы на поверхности нейлонового имплантанта начинается уже в первые минуты после проникновения чужеродного агента. Меланизированная капсула может быть образована в течение 2-х – 24-х часов, но лишь через 72 процесс формирования капсулы полностью завершается (Глулов и др., 2001). В период активного формирования меланотической капсулы (0.25 - 4 часа) мы регистрировали достоверное увеличение активности фенолоксидаз гемолимфы личинок *G. mellonella* (рис. 8), но концентрация ДА в гемолимфе в этот период оставалась на уровне контроля (рис. 9). В данном случае повышение активности фенолоксидаз гемолимфы связано с запуском меланотического каскада, так как этот фермент является ключевым в этом процессе (Ling, Yu, 2005). ДА также является непосредственным участником меланотического каскада (Noguchi et al., 1995; Алексеев и др., 2008; Theopold et al., 2004; Nappi, Christensen, 2005; Watanabe et al., 2013; Kim et al., 2000), но его

концентрация в гемолимфе при инкапсуляции вплоть до 24 часов остается на уровне контроля (рис. 9). Однако, через 24 часа после введения имплантата концентрация ДА резко и достоверно увеличивается. Возможно, данный феномен связан с характером повреждения насекомых. Внедрение инертного объекта, вероятно, не является настолько сильным стрессирующим фактором, чтобы запустить гормональный ответ. Это связано с тем, что в месте проникновения имплантата и ранения, происходит запуск комплекса клеточных и гуморальных реакций, позволяющий быстро локализовать иммунный ответ (Dubovskiy et al., 2010). Можно предположить, что накопление ДА в гемолимфе к 24 часам после внедрения имплантата (рис. 9) связано с подготовкой насекомого к возможному возникновению вторичной инфекции, которая может последовать за асептическим ранением. Данный феномен нуждается в дополнительном изучении.

### **3.3. Влияние грибной инфекции на уровень дофамина насекомых**

#### **3.3.1. Уровень дофамина в гемолимфе *Galleria mellonella* при заражении энтомопатогенным грибом *Beauveria bassiana***

При заражении *G. mellonella* энтомопатогенным грибом *B. bassiana* к 5 суткам эксперимента смертность насекомых в варианте с использованием титра  $10^8$  конидий/мл составляла 80% (рис. 10), в то время как смертность личинок в варианте с использованием титра  $10^6$  конидий/мл составляла лишь 10%. Однако, в варианте с использованием титра  $10^6$  конидий/мл гибель насекомых наступала раньше, чем при использовании титра  $10^8$  конидий/мл. Так,  $LT_{50}$  при использовании титра  $10^6$  конидий/мл составляла  $11 \pm 1.1$  дней, а при использовании титра  $10^8$  конидий/мл  $LT_{50}$   $9 \pm 0.793$  дней ( $\chi^2=7.119$ ,  $P=0.05$ ).

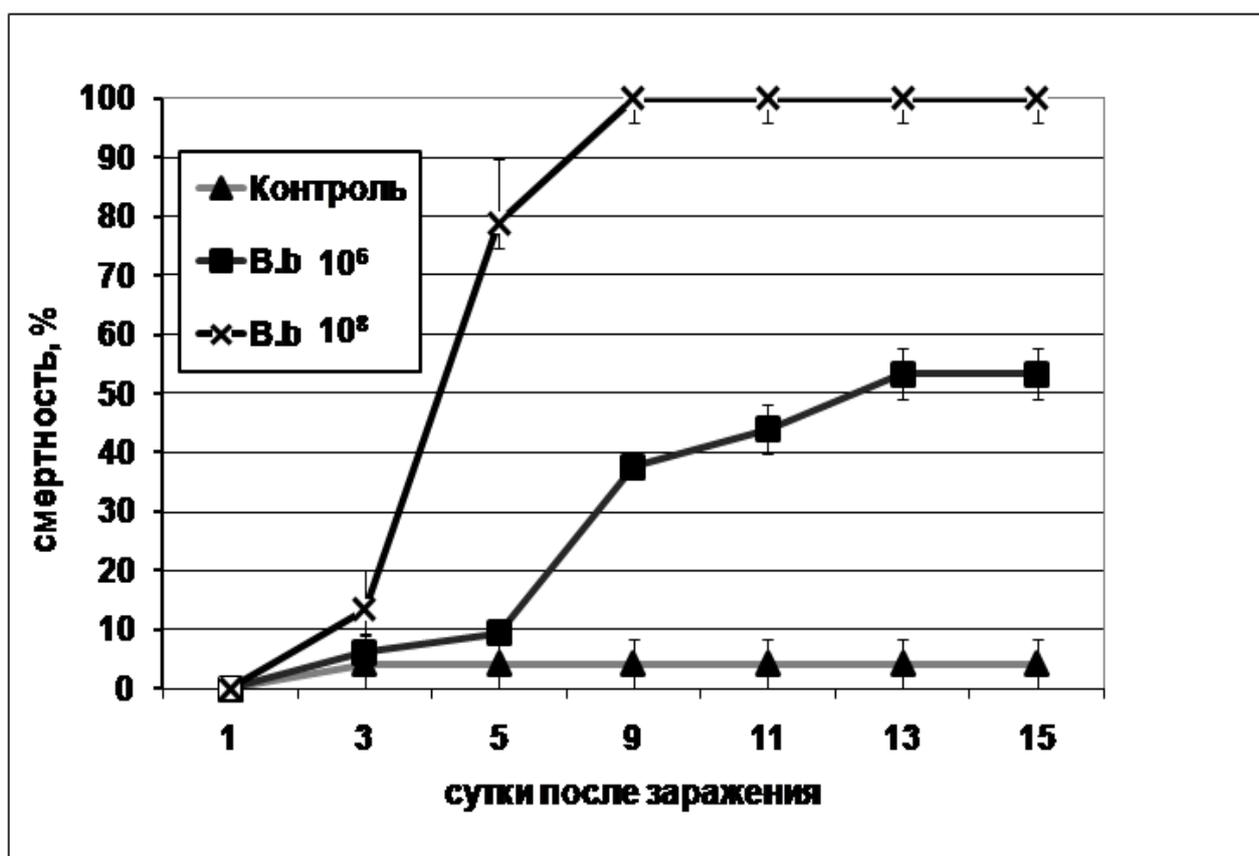


Рис.10. Динамика смертности личинок *G. mellonella* при заражении *B. bassiana* (B.b).

Кроме того, в этом эксперименте мы регистрировали дозозависимое увеличение концентрации ДА. Тенденции к повышению уровня ДА регистрировались, начиная с 3-х суток эксперимента, а на 5 сутки в варианте с применением титра  $10^6$  конидий/мл концентрация ДА достоверно повышалась по сравнению с контролем в 70-80 раз. На 5 сутки эксперимента происходило достоверное увеличение уровня дофамина и в варианте с применением концентрации  $10^6$  конидий/мл и в варианте с применением концентрации  $10^8$  конидий/мл (рис.11).

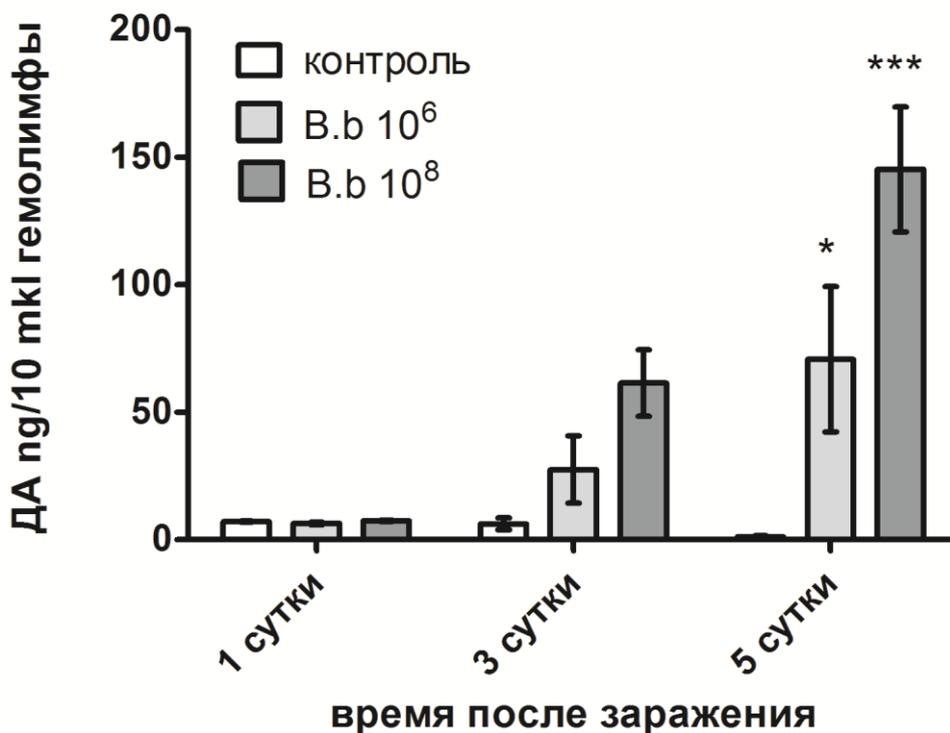


Рис. 11. Уровень дофамина в гемолимфе личинок *G. mellonella* при заражении *B. bassiana* (B.b); \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  по сравнению с контролем на те же сутки;  $n = 50$  на вариант.

### 3.3.2. Уровень дофамина в гемолимфе *Mamestra brassicae* при микозе, вызванном энтомопатогенным грибом *Beauveria bassiana*

Смертность личинок капустной совки через 9 суток после заражения энтомопатогенным грибом *B. bassiana* достигала 40 и 65% в вариантах с использованием титра конидий  $10^5$  и  $10^8$  соответственно ( $\chi^2 = 4.158$ ;  $P = 0.05$ ) (рис.12).

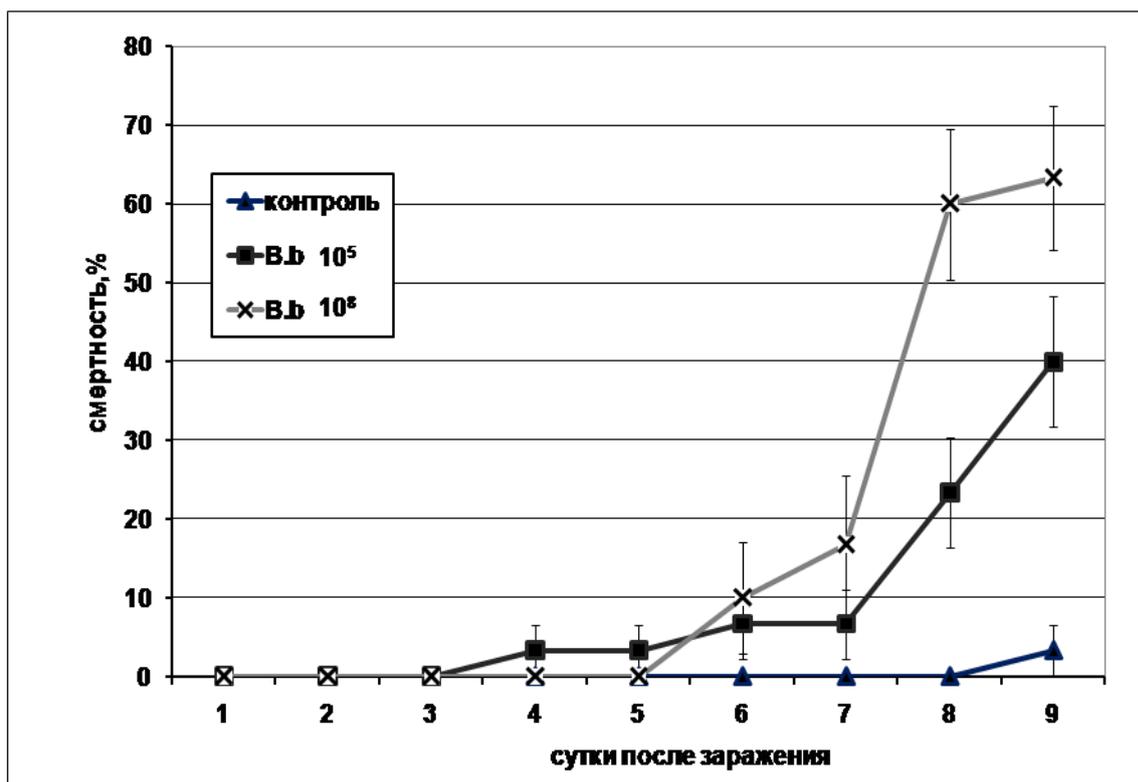


Рис. 12. Динамика смертности личинок *M. brassicae* при заражении *B. bassiana* (B.b).

При заражении личинок *M. brassicae* энтомопатогенным грибом *B. bassiana* было отмечено достоверное увеличение концентрации дофамина в гемолимфе насекомых на третьи сутки эксперимента в 4 раза по сравнению с контролем в варианте с использованием титра конидий  $10^8$  конидий/мл (рис.13).

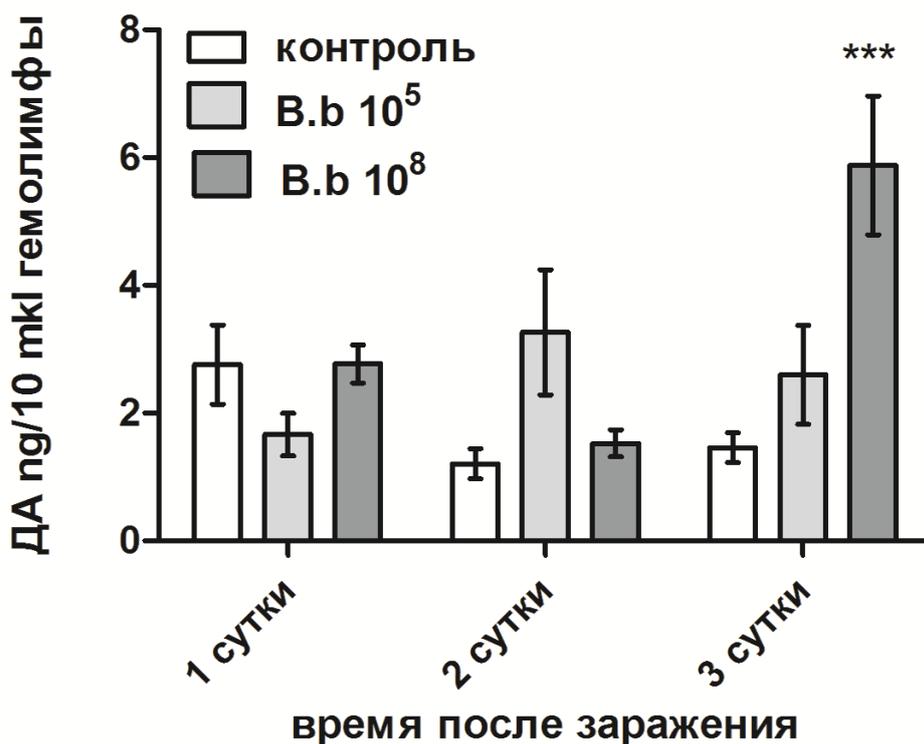


Рис.13. Уровень дофамина в гемолимфе личинок *M. brassicae* при заражении *B. bassiana* (V.b); \*\*\* $p < 0.001$  по сравнению с контролем на те же сутки;  $n=15$  на вариант.

### 3.3.3.Уровень дофамина в гемолимфе *Mamestra brassicae* при микозе, вызванном энтомопатогенным грибом *Metarhizium robertsii*

Смертность личинок капустной совки начиналась с 4 суток (10%) и к 23 суткам достигала 56% в варианте с использованием титра *M. robertsii* 10<sup>8</sup> конидий/мл. При заражении личинок капустной совки титром 10<sup>8</sup> конидий/мл LT<sub>50</sub> составило 16 ±1.76 дней, а при заражении титром 10<sup>5</sup> конидий/мл LT<sub>50</sub> составило 23 дня ( $\chi^2=3.228$ ;  $P=0.05$ ) (рис.14).

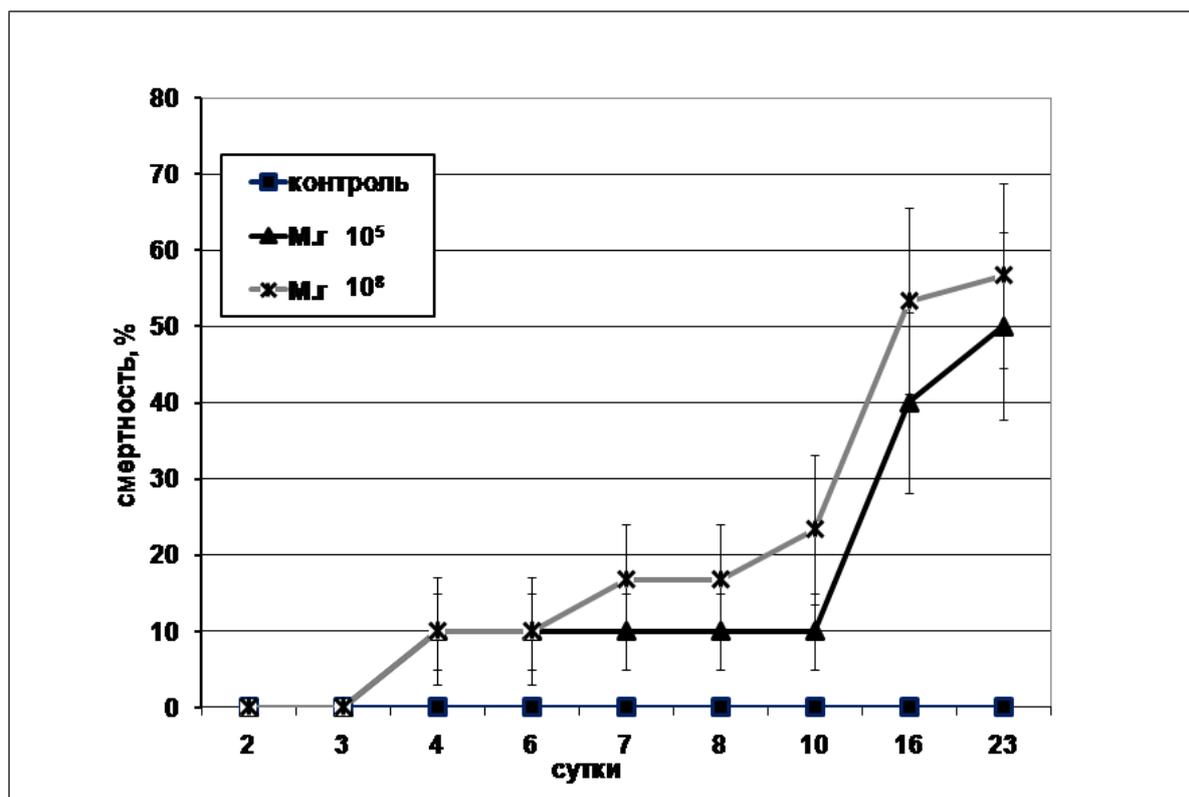


Рис. 14. Динамика смертности личинок *M. brassicae* при заражении *M. robertsii* (М.г).

В варианте с заражением капустной совки *M. brassicae* грибом *M. robertsii* достоверных отличий в уровне дофамина отмечено не было (рис. 15). Однако нами была отмечена та же тенденция, что и в предыдущих экспериментах, а именно - повышение уровня ДА наблюдалось на 2 и 3 сутки и зависело от дозы патогена.

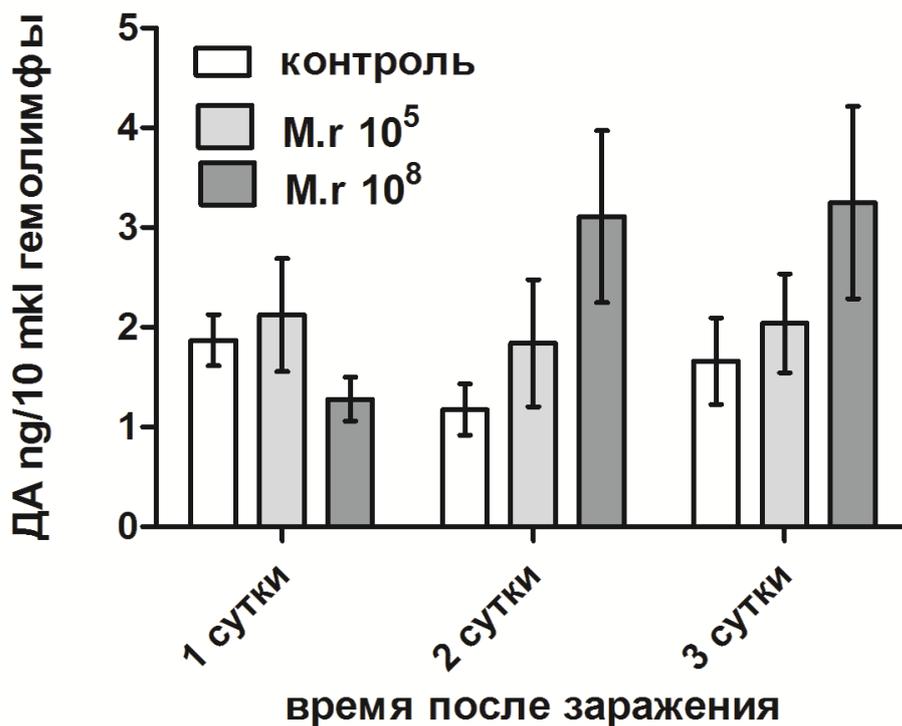


Рис. 15. Уровень дофамина в гемолимфе личинок *M. brassicae* при заражении *M. robertsii* (M.r); n=15 на вариант.

### 3.3.4. Уровень дофамина и активность фенолоксидаз у личинок *Leptinotarsa decemlineata* при микозе, вызванном разными штаммами гриба *Metarhizium robertsii*

При заражении личинок *L. decemlineata* токсигенным штаммом P-72 энтомопатогенного гриба *M. robertsii* гибель личинок происходила значительно раньше, чем при заражении биотрофным штаммом. LT<sub>50</sub> при заражении токсигенным штаммом составило 4±0.52 дня, а при заражении биотрофным штаммом - 9±0.37 дней ( $\chi^2=24$ ; P=0.025) (рис.16).

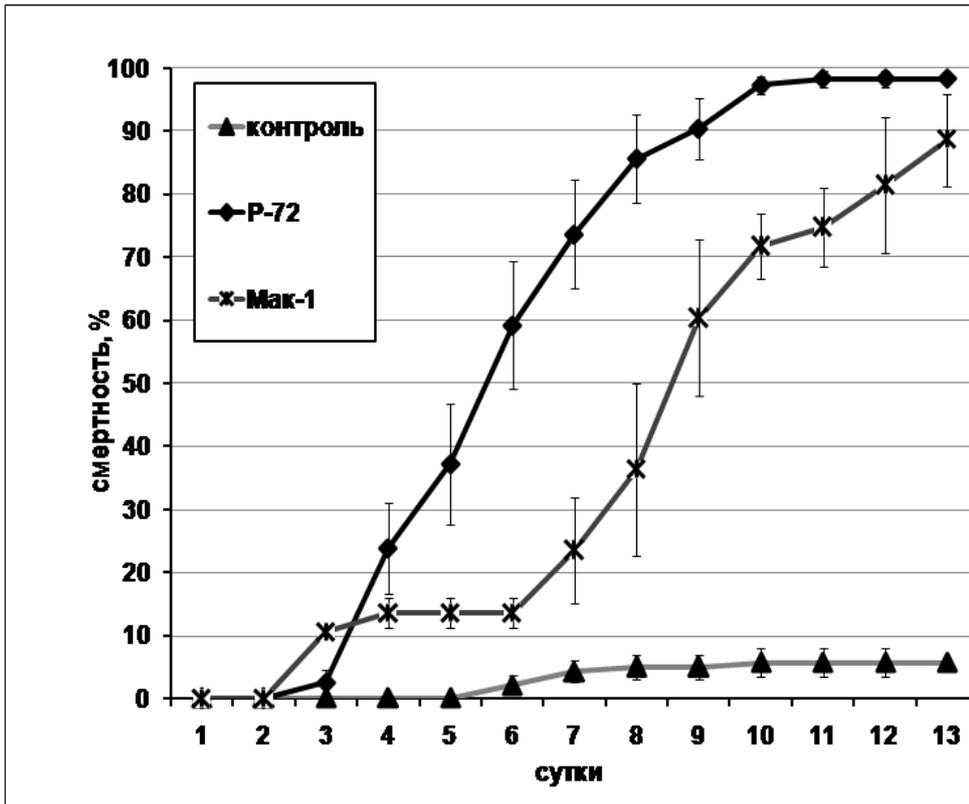


Рис. 16. Динамика смертности личинок *L. decemlineata* при заражении разными штаммами гриба *M. robertsii* (M.r): P-72 - токсигенный штамм, Мак-1 – биотрофный штамм.

При заражении колорадского жука энтомопатогенным грибом *M. robertsii* с разным типом патогенеза (токсигенный штамм P-72 и биотрофный штамм Мак-1) было отмечено достоверное увеличение концентрации ДА на 3 сутки эксперимента по сравнению с контролем. Кроме того, достоверными оказались различия между биотрофным штаммом (Мак-1) и токсигенным штаммом P-72. Концентрация дофамина при заражении биотрофным штаммом была достоверно ниже, чем при заражении токсигенным штаммом в 2,5 раза (рис.17).

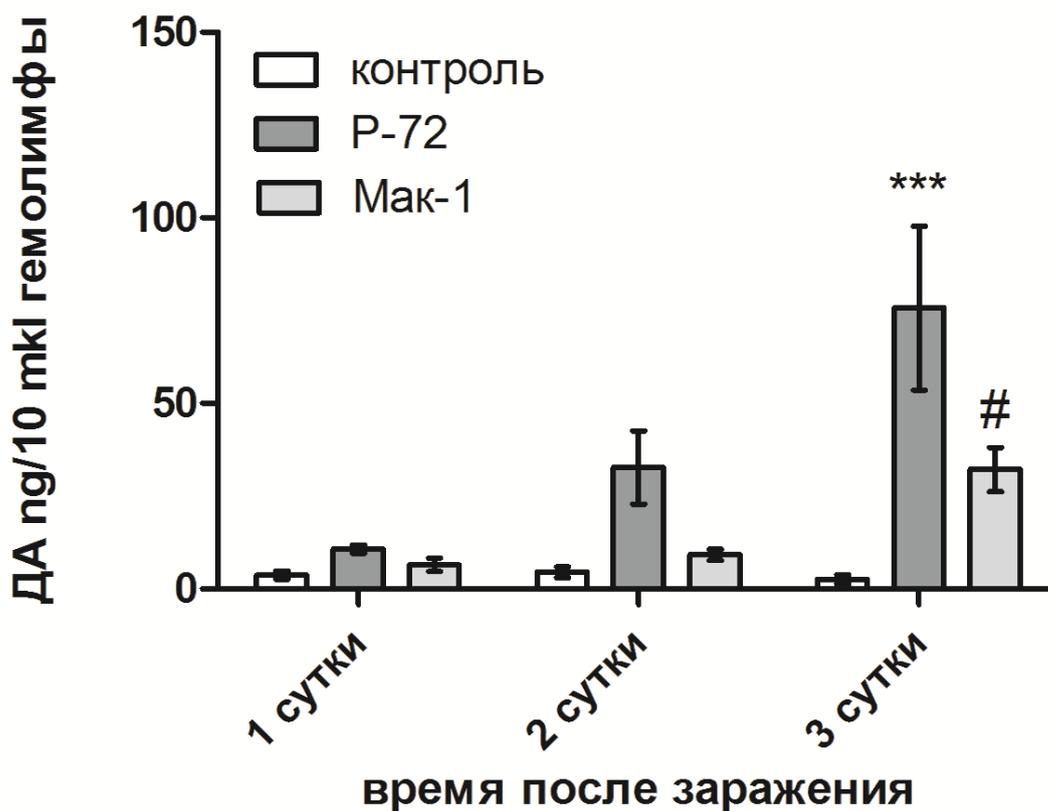


Рис. 17. Уровень дофамина в гемолимфе личинок *L. decemlineata* при заражении разными штаммами гриба *M. robertsii*; \*\*\* $p < 0.001$  по сравнению с контролем на те же сутки; # $-p < 0.01$  по сравнению с токсигенным штаммом *M. robertsii* P-72 на те же сутки;  $n=30$  на вариант.

На фоне повышения концентрации дофамина в гемолимфе происходило достоверное увеличение фенолоксидазной активности на 2 сутки после заражения токсигенным штаммом *M. robertsii* P-72 по сравнению с контролем (рис.18). На третьи сутки после заражения биотрофным штаммом МАК-1 было отмечено достоверное повышение фенолоксидазной активности гемолимфы личинок колорадского жука по сравнению с контролем (рис.18).

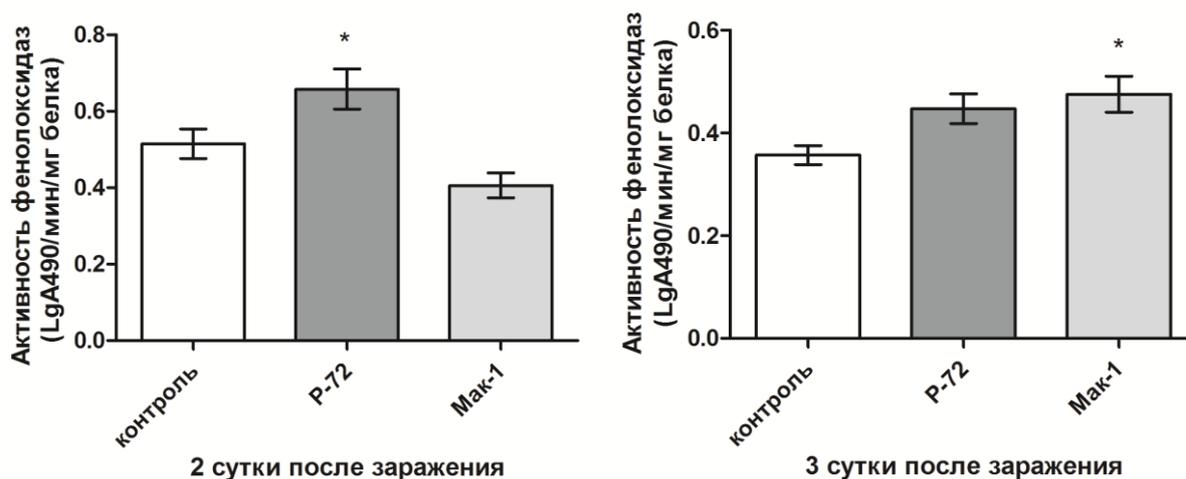


Рис. 18. Активность фенолоксидаз в гемолимфе личинок *L. decemlineata* на 2-ые и 3-и сутки после заражения разными штаммами гриба *M. robertsii*; \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем на те же сутки;  $n = 30$  на вариант.

Таким образом, отмеченное нами увеличение уровней ДА при заражении личинок *Galleria mellonella* и *Mamestra brassicae* энтомопатогенными грибами *Beauveria bassiana* и *Metarhizium robertsii* (рис.11, 13, 15) может быть связано не только с выбросом данного вещества в качестве нейрогомона при общем стрессировании организма, но и с непосредственным участием ДА в меланогенезе, который является важнейшим средством защиты организма насекомого от патогенов, проникающих через кутикулу (Dubovskiy et al., 2013). Аналогичные данные были получены при заражении личинок *G. mellonella* энтомопатогенным грибом *Metarhizium anisopliae* (Алексеев и др., 2007). Авторы показали пятикратное повышение уровня ДА у личинок *G. mellonella* через 48 часов после заражения энтомопатогенным грибом *M. anisopliae* по сравнению с контролем

При заражении колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* штаммами энтомопатогенного гриба *Metarhizium robertsii* с разным типом патогенеза (биотрофный штамм Мак-1 и токсигенный штамм Р-72) мы показали повышение уровня ДА в варианте с обоими штаммами на третьи сутки после заражения (рис. 17). По нашему мнению, существенное различие в уровнях ДА у насекомых при

заражении разными штаммами гриба *M. robertsii* скорее всего связано с особенностями течения микозов, характерных для данных штаммов. Конидии штамма P-72 более интенсивно прорастают на кутикуле насекомых по сравнению с менее вирулентным штаммом МАК-1, что приводит к более быстрому проникновению микопатогена в гемоцель насекомых и более выраженному ответу со стороны организма (Крюков и др., 2011). Также мы регистрировали достоверное увеличение активности фенолоксидаз гемолимфы колорадского жука на вторые и третьи сутки после заражения. Интересен тот факт, что на вторые сутки наблюдалось повышение активности фенолоксидаз гемолимфы насекомых в варианте с заражением токсигенным штаммом P-72, а на третьи сутки тот же эффект мы наблюдали в варианте с заражением биотрофным штаммом Мак-1 (рис. 18). Вероятнее всего, такие отличия также связаны с особенностями течения микозов и вирулентных свойств каждого штамма. Конидии токсигенного штамма P-72 обладают меньшим периодом активации, чем конидии биотрофного штамма Мак-1 (Крюков и др., 2011), что приводит к более быстрому проникновению конидий штамма P-72 в гемоцель и быстрой активации иммунной системы хозяина, что выражается в повышении активности фенолоксидаз гемолимфы насекомых. Отмеченное нами увеличение активности фенолоксидаз в гемолимфе личинок *L. decemlineata* при развитии микоза согласуется с результатами работ других авторов. Так, при заражении личинок *Galleria mellonella* энтомопатогенным грибом *Beauveria bassiana* было отмечено повышение активности фенолоксидаз гемолимфы через 12 часов после топикальной обработки (Dubovskiy et al., 2013). При заражении личинок *Galleria mellonella* энтомопатогенными грибами *Beauveria bassiana* и *Cordyceps militaris* показано увеличение активности фенолоксидаз в гемолимфе насекомых на третьи сутки после заражения (Kryukov et al., 2015). Также, было зафиксировано повышение активности фенолоксидаз гемолимфы личинок *L. decemlineata* на третьи сутки после заражения *Cordyceps militaris* (Kryukov et al., 2014). Было показано, что при заражении имаго кузнечика *Melanoplus sanguinipes* энтомопатогенным грибом *B. bassiana* также происходит увеличение активности фенолоксидаз в гемолимфе

насекомых (Gillespie, Khachatourians, 1992). Кроме того, было установлено, что при заражении личинок 6 возраста совки *Spodoptera exigua* энтомопатогенным грибом *B. bassiana* происходит повышение активности фенолоксидаз гемолимфы (Hung, Voucias, 1996).

### 3.4. Влияние бактериальной и смешанной бактериально-грибной инфекции на уровень дофамина насекомых

#### 3.4.1. Уровень дофамина у личинок *Leptinotarsa decemlineata* при бактериозе, вызванном бактериями *Bacillus thuringiensis*

При заражении личинок *L. decemlineata* энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis* гибель насекомых при использовании титра бактерий  $2 \times 10^9$  спор и кристаллов/мл была выше чем при заражении насекомых более низким титром бактерий ( $5 \times 10^8$ ) ( $\chi^2=31.41$ ;  $P=0.025$ ) (рис. 19).

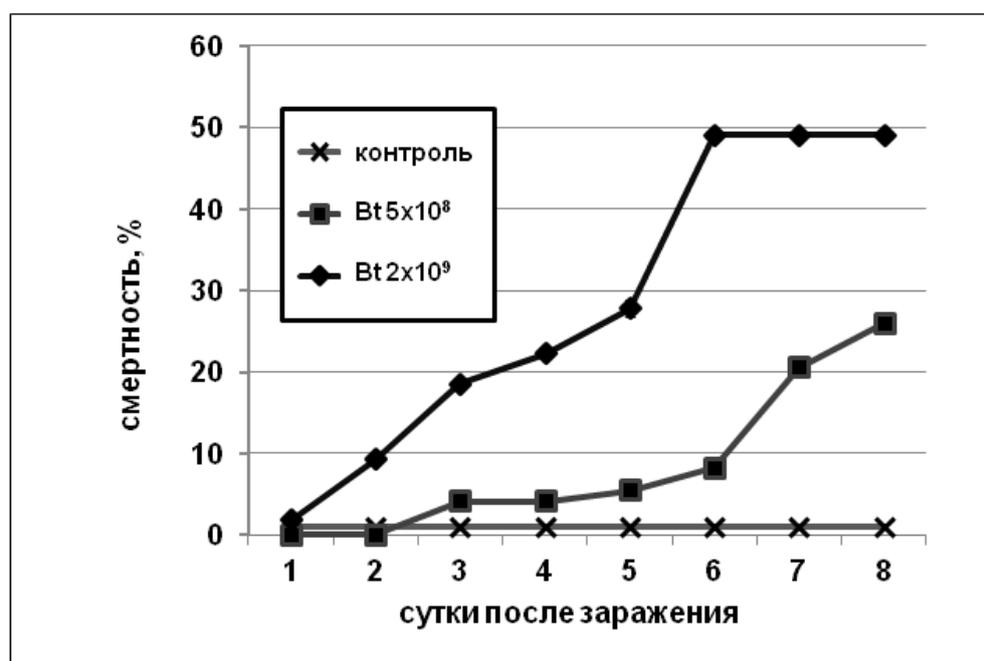


Рис. 19. Динамика смертности личинок *L. decemlineata* при развитии бактериальной инфекции, вызванной бактериями *B. thuringiensis* (Bt).

В этом же эксперименте нами было отмечено достоверное увеличение уровня ДА в 20 раз по отношению к контролю у личинок уже на вторые сутки после заражения в варианте с применением титра бактерий  $5 \times 10^8$  спор и кристаллов/мл. В варианте с использованием титра  $2 \times 10^9$  было получено достоверное увеличение уровня ДА в 30 раз по отношению к контролю. На третьи сутки эксперимента также было получено достоверное увеличение уровней ДА в гемолимфе по отношению к контролю при использовании двух титров бактерий (рис.20).

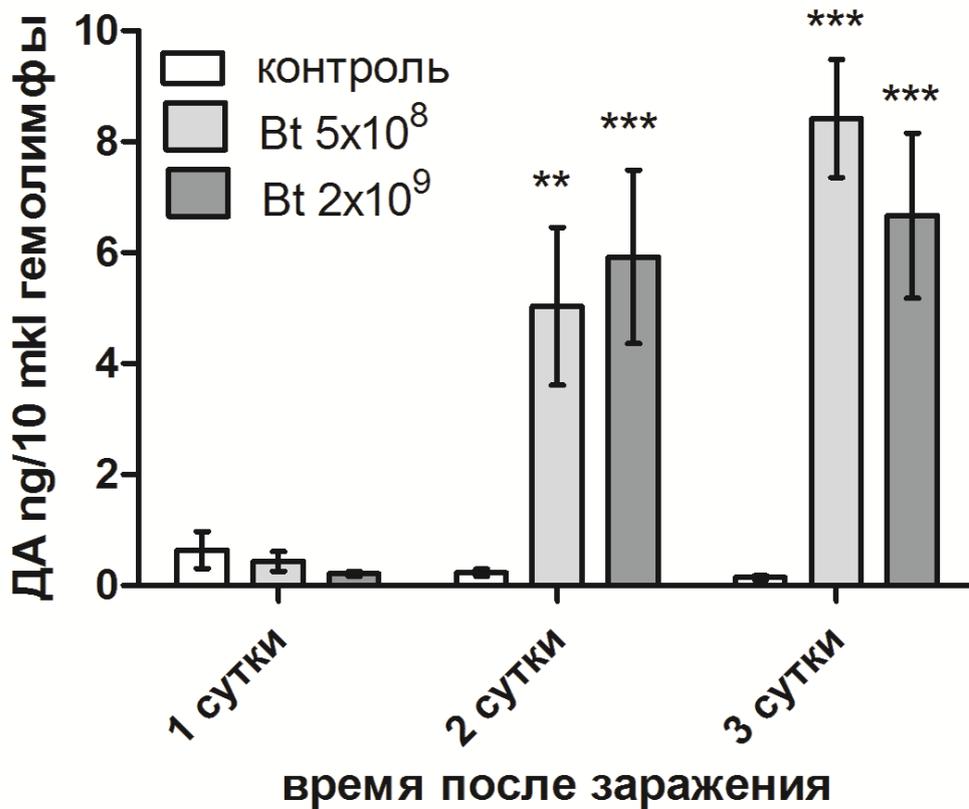


Рис. 20. Уровень дофамина в гемолимфе личинок *L. decemlineata* при заражении бактериями *B. thuringiensis*; \*\*\* $p < 0.001$  по сравнению с контролем на те же сутки; \*\* $p < 0.01$  по сравнению с контролем на те же сутки;  $n=30$  на вариант.

### 3.4.2. Уровень дофамина и активность фенолоксидаз у личинок *Leptinotarsa decemlineata* при развитии смешанной инфекции, вызванной энтомопатогенными грибом *Metarhizium robertsii* и бактериями *Bacillus thuringiensis*

В результате совместного заражения грибом и бактериями наблюдался синергизм в смертности личинок колорадского жука. Гибель насекомых в варианте с совместным применением гриба и бактерий наступала раньше, чем в других вариантах ( $LT_{50}=2\pm 0.114$  дня) (рис. 21). Гибель личинок *L. decemlineata* при заражении бактериями *B. thuringiensis* достоверно отличалась от контроля (рис. 21), что связано с использованием низкого ( $2,5\times 10^7$  спор и кристаллов/мл) титра бактерий *B. thuringiensis*. При грибном монозаражении  $LT_{50}$  составляло  $8\pm 0.267$  дней.

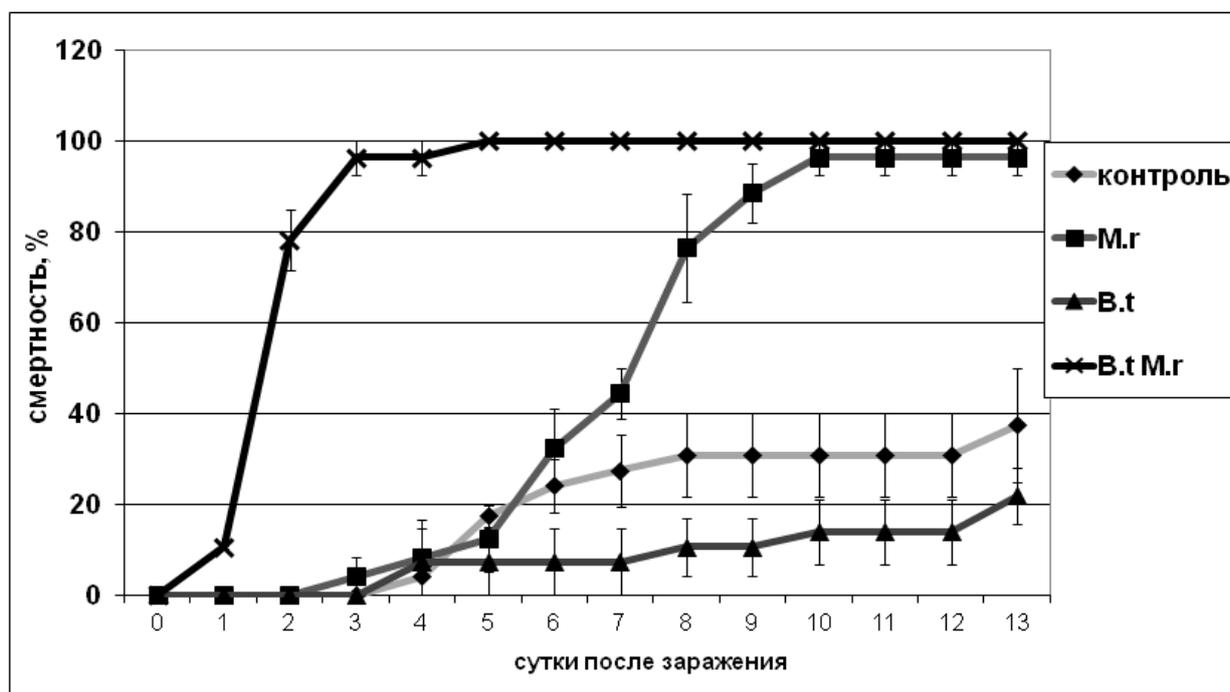


Рис. 21. Динамика смертности личинок *L. decemlineata* при развитии микс-инфекции, вызванной энтомопатогенными грибом *M. robertsii* (M.r) и бактериями *B. thuringiensis* (B.t).

Таким образом, мы можем говорить о синергическом эффекте в смертности насекомых при совместном использовании гриба *M. robertsii* и бактерий *B. thuringiensis* по сравнению с бактериальным ( $\chi^2=58.6$ ;  $P=0.008$ ) и грибным ( $\chi^2=52.9$ ;  $P=0.01$ ) монозаражением.

При совместном заражении личинок бактериями и грибами было показано достоверное увеличение уровня дофамина при грибной моноинфекции на 2 и 3 сутки эксперимента. Тенденция к увеличению уровня дофамина наблюдалась на 3 сутки после заражения энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis*. В остальных вариантах эксперимента достоверных отличий в уровнях дофамина отмечено не было (рис.22).

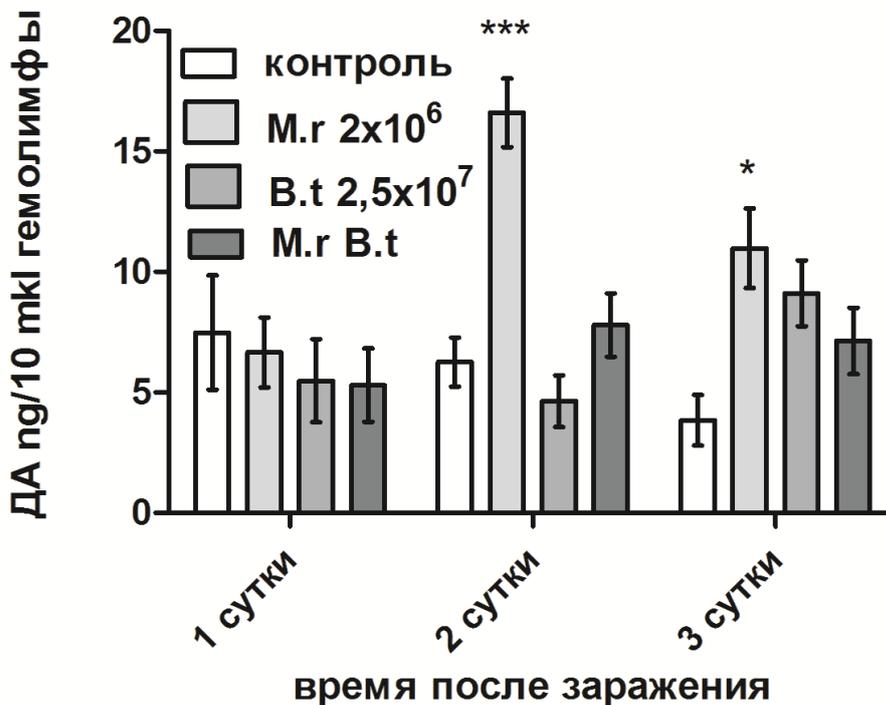


Рис.22. Уровень дофамина у личинок *L. decemlineata* при развитии смешанной инфекции, вызванной энтомопатогенными грибом *M. robertsii* и бактериями *B. thuringiensis*; \*\*\* $p<0.001$  по сравнению с контролем на те же сутки; \* $p<0.05$  по сравнению с контролем на те же сутки;  $n=45$  на вариант.

При этом на 3 сутки эксперимента было отмечено достоверное повышение активности фенолоксидаз гемолимфы в варианте с бактериальной моноинфекцией по сравнению с контролем (рис.23).

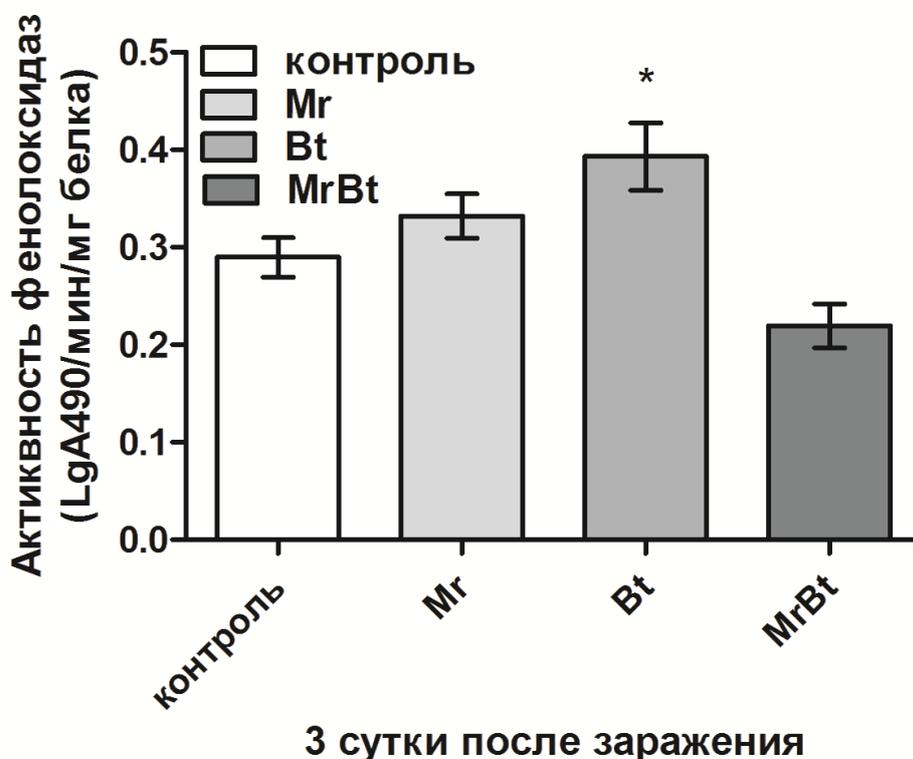


Рис. 23. Активность фенолоксидаз гемолимфы личинок *L. decemlineata* при развитии микс-инфекции, вызванной энтомопатогенным грибом *M. robertsii*(Mr) и бактерией *B. thuringiensis*(Bt); \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем;  $n=30$  на вариант.

Отмеченное нами повышение уровня ДА (рис. 20) в гемолимфе колорадского жука при развитии бактериальной инфекции свидетельствует о развитии неспецифической стресс-реакции организма насекомого, возникающей в ответ на воздействие бактерий *B. thuringiensis*. Следует подчеркнуть, что бактерии *B. thuringiensis* вызывают кишечную инфекцию, приводящую к лизису эпителиальной ткани кишечника (Portugal et al., 2014; Adang et al., 2014). Это связано с действием Cry токсина (Hilbeck, Schmidt, 2006). Нарушение целостности кишечника способствует проникновению в гемоцель различных бактерий, включая бактерии *B. thuringiensis*. Вследствие проникновения и развития

инфекции активируется клеточный и гуморальный иммунные ответы организма насекомого (Grizanova et al, 2014). Так, было показано увеличение активности фагоцитоза и инкапсуляции (Dubovskiy et al., 2008) и активности фенолоксидаз гемолимфы (Rahman et al., 2004; Grizanova et al, 2014) насекомых при бактериальной инфекции, вызванной *B. thuringiensis*. Исходя из вышеизложенного, можно сказать, что повышение концентрации ДА может быть связано с активацией профенолоксидазного каскада при бактериозе. До конца не понятен вклад ДА в защитные реакции против бактерий, но можно предположить, что повышение его уровня происходит в ответ на воздействие таких стресс-факторов как токсины бактерий или как часть генерализованной стресс-реакции.

Полученный нами синергический эффект в смертности колорадского жука при совместном заражении энтомопатогенными грибом *M. robertsii* и бактериями *B. thuringiensis* согласуется с результатами опытов по одновременной обработке грибными и бактериальными энтомопатогенами и биопестицидами на их основе (Wraight, Ramos, 2005; Крюков и др., 2009). Авторы предполагают, что вероятные причины синергизма между грибными и бактериальными патогенами – это токсикоз, вызванный бактериями. При бактериальном монозаражении смертность личинок не отличалась от контроля (рис. 21), что объясняется использованием низкого ( $2,5 \times 10^7$  спор и кристаллов/мл) титра бактерий *B. thuringiensis*. Но, несмотря на низкую гибель насекомых, это может приводить к изменению ряда параметров физиологических систем. В частности, у насекомых, зараженных бактериями, происходило снижение количества потребляемого корма, замедление роста, снижение веса. В свою очередь все эти факторы могут благоприятно действовать на развитие гриба в гемоцеле насекомого, что вызывает эффект синергизма в смертности насекомых в варианте со смешанным бактериально-грибным заражением (рис. 21).

Кроме того, мы регистрировали достоверное увеличение уровня ДА при грибной моноинфекции на 2 и 3 сутки эксперимента (рис. 22). Тенденция к увеличению уровня дофамина наблюдалась на 3 сутки после заражения

энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis*. В остальных вариантах эксперимента достоверных отличий в уровне дофамина отмечено не было, что, скорее всего, связано с сильнейшей интоксикацией организма насекомого и высокой смертностью насекомых при совместном бактериально-грибном заражении ( $LT_{50}=2\pm 0.114$  дня) (рис. 21).

### **3.5. Уровень дофамина и активность фенолоксидаз у личинок *Leptinotarsa decemlineata* при совместном воздействии энтомопатогенного гриба *Metarhizium robertsii* и пиримифос-метила**

Как известно, под контролем нейроэндокринной системы находятся жизненно важные системы организма насекомого, в том числе иммунная система (Dubovskiy et al., 2013). В связи с этим, воздействие на сложный нейроэндокринный комплекс, так или иначе, должно сказаться на иммунных реакциях и синтезе нейрогормонов насекомых. В связи с этим нами были проведены опыты по совместной асинхронной обработке личинок колорадского жука грибами *M. robertsii* и фосфорорганическим инсектицидом пиримифос-метилом (ПМФМ).

Предварительная обработка сублетальными дозами ПМФМ снижает чувствительность насекомых к грибам (ПМФМ+Mr), в то время как обработка ПМФМ после заражения грибом приводит к увеличению смертности от патогена (Mr+ПМФМ). Так, гибель в варианте Mr+ПМФМ наступает раньше ( $LT_{50}=8\pm 0.28$  дней), чем в варианте ПМФМ+Mr ( $LT_{50}=9\pm 0.38$  дней).

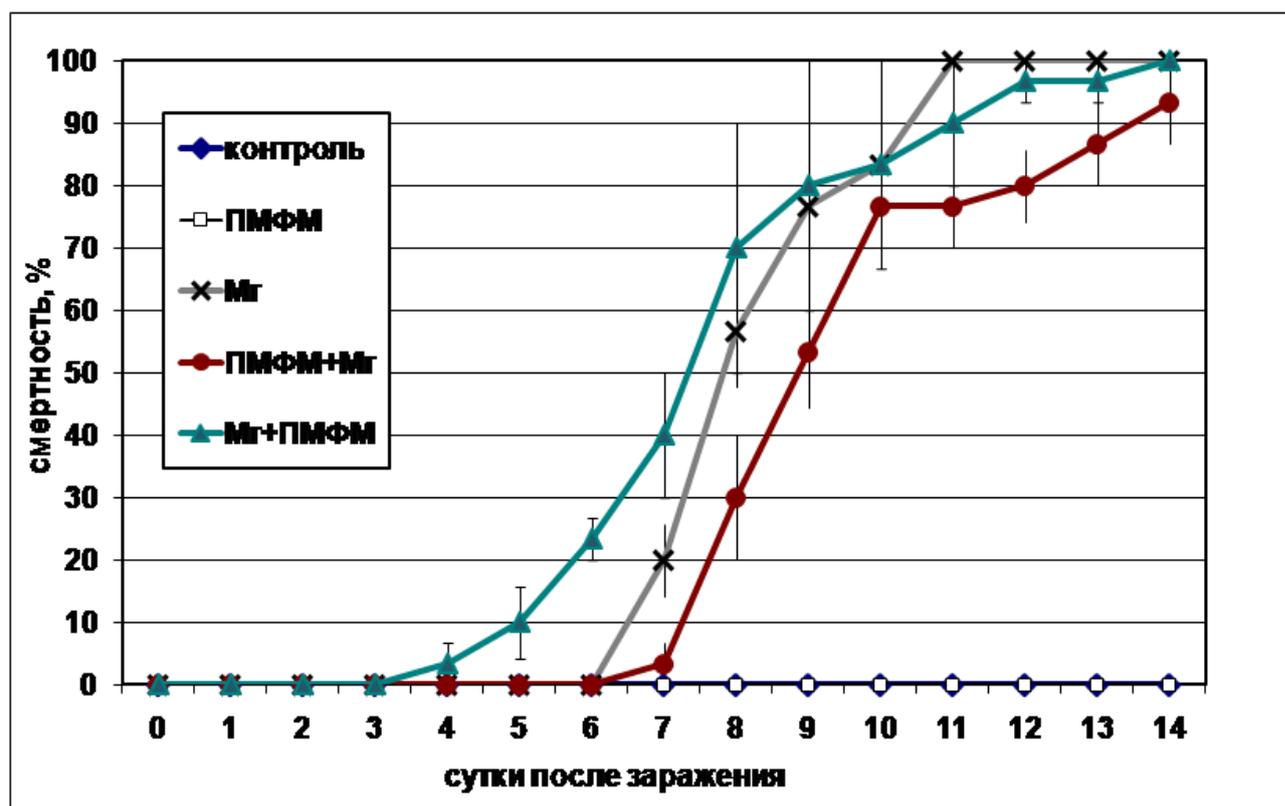


Рис. 24. Динамика смертности личинок *L. decemlineata* при совместном воздействии энтомопатогенного гриба *M. robertsii* (*Mr*) и пиримифос-метила (ПМФМ).

При совместной асинхронной обработке личинок колорадского жука грибом *M. robertsii* (*Mr*) и фосфорорганическим инсектицидом пиримифос-метилом (ПМФМ) было показано, что уровень ДА при заражении грибом достоверно увеличивался через 12 часов после воздействия (рис. 25). Кроме того, через 12 часов после обработки инсектицидом у насекомых регистрировали достоверное снижение уровня ДА по сравнению с контролем (рис. 25).

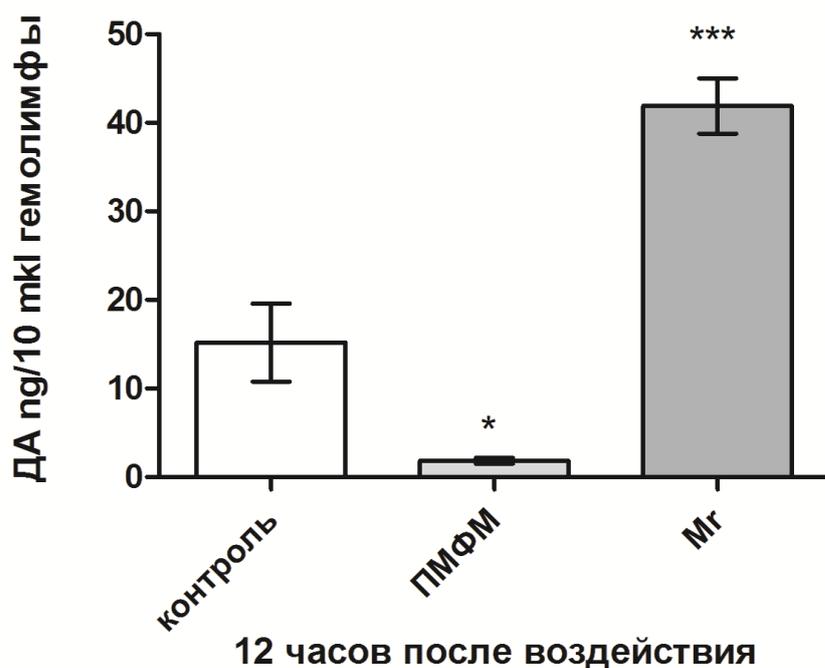


Рис. 25. Уровень дофамина у личинок *L. decemlineata* при совместном воздействии энтомопатогенного гриба *M. robertsii* (Mr) и пиримифос-метила (ПМФМ) через 12 часов после воздействия; \*\*\* $p < 0.001$  по сравнению с контролем;  $n=30$  на вариант.

Наиболее интенсивное и достоверное снижение концентрации ДА наблюдалось в вариантах с совместным применением ПМФМ и *M. robertsii* (рис. 26).

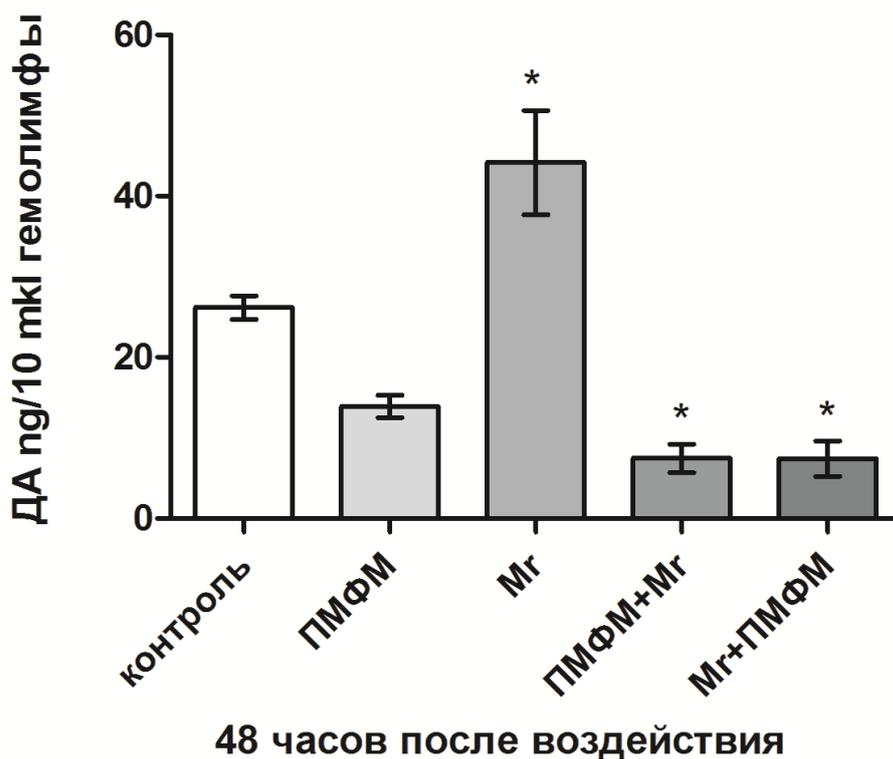


Рис. 26. Уровень дофамина у личинок *L. decemlineata* при совместном воздействии энтомопатогенного гриба *M. robertsii* (Mr) и пиримифос-метила (ПМФМ) через 48 часов после воздействия; \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем;  $n = 30$  на вариант.

Нами не было получено достоверных отличий по активности фенолоксидаз в гемолимфе личинок колорадского жука при асинхронной обработке насекомых энтомопатогенным грибом *M. robertsii* (Mr) и инсектицидом пиримифос-метилом (ПМФМ) (рис.27).

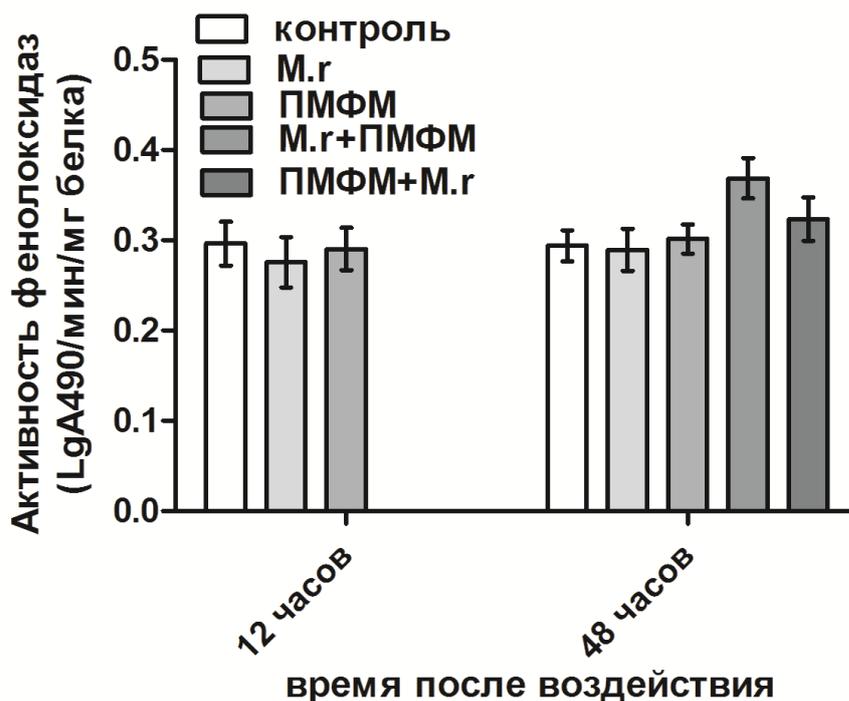


Рис. 27. Активность фенолоксидаз гемолимфы личинок *L. decemlineata* при совместном воздействии энтомопатогенного гриба *M. robertsii* (*Mr*) и пиримифос-метила (ПМФМ) через 12 и 48 часов после воздействия;  $n=15$  на вариант.

ФОС связывают ацетилхолинэстеразу, тем самым препятствуя разложению ацетилхолина в синапсах. Результатом воздействия ФОС является дисфункция нервной системы, что выражается в треморе, конвульсиях и параличе насекомых (Dubovskiy et al., 2013 b).

При совместном воздействии энтомопатогенного гриба *M. robertsii* и пиримифос-метила (ПМФМ) мы наблюдали синергизм в смертности насекомых по сравнению с грибным монозаражением и воздействием сублетальными дозами чистого инсектицида (рис. 24). Подобный эффект наблюдался только в одном случае - при заражении грибом с последующей обработкой насекомых ПМФМ. Полученные нами данные полностью согласуются с результатами других авторов, которые регистрировали эффект синергизма при совместном применении энтомопатогенного гриба *M. anisopliae* и инсектицида на основе пиримифос-метила против колорадского жука (Dubovskiy et al., 2010). Кроме того, сходные

результаты были получены при совместном применении токсинов энтомопатогенных грибов *Metarhizium* и *Beauveria* и хлорорганических соединений, ФОС и неоникотиноидов против медведицы *Spilarctia obliqua* (Purwar, Sachan, 2006).

Повышение уровня ДА мы фиксировали только в варианте с грибным монозаражением (рис. 25, 26), а самое интенсивное снижение уровня ДА мы регистрировали в вариантах с совместным применением гриба и инсектицида и с применением чистого инсектицида (рис. 25, 26). Реакция организма насекомого на химическое отравление оказалась отличной от реакции на другие типы стрессирующих воздействий. Скорее всего, подобное явление связано с особенностями воздействия пиримифос-метила. Вследствие того, что мишенью данного инсектицида является ацетилхолинэстераза и его воздействие приводит к нарушению функционирования нервной системы (Pore, 1999), можно предположить, что при этом нарушается и выброс нейрого르몬ов и нейромедиаторов, в том числе и ДА. Вероятно, этот эффект мы и наблюдаем при заражении насекомых вышеупомянутым инсектицидом (рис. 25, 26).

Достоверных отличий по активности фенолоксидаз в гемолимфе личинок колорадского жука при асинхронной обработке насекомых энтомопатогенным грибом *M. robertsii* (Mr) и инсектицидом пиримифос-метилом (ПМФМ) нами не было зарегистрировано (рис.27). Похожие результаты были получены другими исследователями при воздействии сублетальными дозами пиримифос-метила на личинок колорадского жука (Dubovskiy et al., 2010). Вероятнее всего, отсутствие достоверных отличий в активности фенолоксидаз гемолимфы при воздействии пиримифос-метила может быть связано с низкой дозой, использованной в данном эксперименте.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Любой инфекционный процесс независимо от возбудителя является сложным явлением, затрагивающим многие физиологические системы организма хозяина. В первую очередь, происходит нарушение нормального функционирования жизненно важных систем организма. Это связано не только с действием различных факторов «агрессии» патогенных микроорганизмов, но и с запуском различных защитных систем и компенсаторных механизмов организма хозяина. В последнем случае происходит модуляция различных звеньев иммунной системы, одновременно меняется гормональный статус организма за счет выброса различных медиаторов, что приводит к изменению общего метаболизма. К настоящему времени существует мало работ по изучению влияния различных патогенов на гормональный статус насекомых (Алексеев и др., 2007; Wojda, Jakubowicz, 2007; Wojda et al., 2009; Wojda, Taszłow, 2013). Кроме того, основная масса этих исследований, как правило, проводилась на последних стадиях заболевания. В некоторых случаях можно отметить не совсем корректное моделирование инфекционного процесса, например микоза, когда заражение грибами осуществляли путем инъекции в гемоцель, что кардинально отличается от естественных путей проникновения в организм (Wojda et al., 2009). При этом следует отметить, что именно первые этапы являются ключевыми для патогенеза (Борисов и др., 2001). В частности, при возникновении микозов насекомых конидии энтомопатогенных грибов прикрепляются к поверхности кутикулы, после чего начинают прорастать. При этом грибы выделяют большое количество гидролитических ферментов и токсинов, что является стимулирующим фактором для иммунной и гормональной систем организма хозяина (Bidochka, Khachatourians, 1987,1988,1990; Bradfish, Harmer, 1990;Cavelier et al., 1998). При бактериозе, вызванном энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis* проникновение патогена происходит через кишечник и если бактерии смогут преодолеть этот барьер, то это закончится септициемией. В связи с этим, уже на первых этапах инфекционного процесса насекомые подвергаются

стрессирующему действию токсинов и гидролитических ферментов патогенных микроорганизмов (Roberts, Leger, 2004; Adang et al., 2014).

Вполне закономерно предположить, что ответ организма насекомого на заражение энтомопатогенами будет схожим с ответом на воздействия стресс-факторов химической природы: различных инсектицидов, поллютантов и т.д. В нашем исследовании при изучении бактериозов и микозов у разных видов насекомых отрядов *Lepidoptera* и *Coleoptera* были обнаружены изменения в уровнях ДА такие же, как при воздействии абиотических стресс-факторов (температуры и механических повреждений). При заражении энтомопатогенными бактериями и грибами происходило резкое повышение уровня ДА у колорадского жука, вошинной огневки и капустной совки. Кроме того, при заражении колорадского жука энтомопатогенными грибами и бактериями мы регистрировали повышение активности фенолоксидаз гемолимфы насекомых. Можно предположить, что ДА при развитии инфекционного процесса, с одной стороны выступает как иммуностимулятор, активируя клеточный иммунный ответ, с другой, непосредственно включаясь в меланотический каскад, участвует в образовании меланинов. Однако воздействие химических инсектицидов не привело к повышению уровня ДА. Возможно, подобное явление связано с механизмом действия выбранного нами инсектицида, который является необратимым ингибитором АХЭ (Pore, 1999). Также, возможно, это связано с низкими (сублетальными) дозами, которых недостаточно для запуска стресс-реакции.

Мы установили, что в зависимости не только от вида патогена, но и от его штаммовой принадлежности может меняться ответ организма на заражение, что выражается в разном уровне ДА. Так, штамм Р-72 энтомопатогенного гриба *M. robertsii* с токсигенной жизненной стратегией, характеризующийся высоким уровнем синтеза деструксинов (Крюков и др., 2011), на первых этапах инфекционного процесса вызывает более резкий подъем уровня ДА, чем штамм Мак-1 с биотрофной жизненной стратегией, у которого токсинов образуется значительно меньше.

Полученные нами результаты позволяют говорить о феноменологической закономерности в ответе на воздействие стресс-факторов различной природы как абиотических, так и биотических. Вероятно, ключевую роль здесь играют сигнальные пути активации физиологических систем организма насекомого, которые запускаются при нарушении покровов вследствие воздействия температуры и механических повреждений, или нарушении функционирования эпителиальных или эпидермальных клеток насекомых (при токсикозах, вызванных инсектицидами или энтомопатогенными микроорганизмами). Известно, что ДА как нейрогормон является одним из регуляторов энергетического метаболизма (Груntenко, 2008), поэтому повышение его уровня может увеличивать эффективность иммунной системы и репарационных процессов в ответ на повреждение патогенами. С другой стороны, увеличение уровня ДА может приводить к изменению вителлогенеза благодаря способности ДА регулировать уровень ювенильного гормона, который в свою очередь регулирует вителлогенез (Gruntenko, Rauschenbach, 2008; Gruntenko et al., 2012). В данном случае можно говорить о своеобразной «цене» за повышенную устойчивость к инфекциям (Lawniczak et al., 2006). Хотя данные по влиянию ДА на формирование яйцекладок у насекомых немногочисленны и достаточно трудно говорить о его значении при формировании яиц, существуют работы, показывающие, что ДА необходим для нормального развития ооцитов (Bloch et al., 2000).

Таким образом, различные патогены, вызывающие заболевания насекомых могут выступать как стресс-факторы для организма насекомого. В связи с этим, вполне понятны общие закономерности увеличения уровня ДА при влиянии стрессирующих факторов абиотической природы и патогенов.

## ВЫВОДЫ

1. Воздействие стресс-факторов абиотической природы (перегрев, механические повреждения) приводит к повышению уровня дофамина в гемолимфе капустной совки *M. brassicae* и вошинной огневки *G. mellonella*.

2. При введении нейлонового имплантата в период активного формирования капсулы происходило увеличение активности фенолоксидаз гемолимфы личинок вошинной огневки *G. mellonella*, в то время как уровень дофамина не изменялся. Взаимосвязи между уровнем дофамина и интенсивностью инкапсуляции не выявлено.

3. При развитии микозов вошинной огневки *G. mellonella*, колорадского жука *L. decemlineata* и капустной совки *M. brassicae*, вызванных энтомопатогенными грибами *B. Bassiana* и *M. robertsii*, происходит резкое повышение уровня дофамина в гемолимфе.

4. Степень повышения уровня дофамина и активности фенолоксидаз в гемолимфе колорадского жука *L. decemlineata* зависит от свойств штаммов энтомопатогенного гриба *M. robertsii*. Штаммы с более высоким уровнем синтеза токсинов вызывают более выраженный ответ организма насекомого, что проявляется в повышенном уровне как дофамина, так и активности фенолоксидаз в гемолимфе личинок.

5. Уровень дофамина в гемолимфе личинок колорадского жука *L. decemlineata* повышается при инфицировании энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis* и зависит от количества инфекционного начала.

6. При совместной асинхронной обработке личинок колорадского жука грибом *M. robertsii* и фосфорорганическим инсектицидом пиримифос-метилом (ФОС) происходит значительное увеличение уровня дофамина при грибном заражении. Однако ФОС не влияет на уровень дофамина в гемолимфе обработанных насекомых.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

проФО	профенолоксидаза
ДА	дофамин
СА	<i>corpus allatum</i>
СС	<i>corpus cardiacum</i>
НСН	нейросекреторные нейроны
НСМ	нейросекреторный материал
ЮГ	ювенильный гормон
ПТТГ	проторакотропные гормоны
АКГ	адипокинетические гормоны
ФО	фенолоксидаза
TDC	тирозиндекарбоксилаза,
ТВН	тираминбетагидроксилаза
ТРН	триптофангидроксилаза
ПМ	перитрофический матрикс
ДОФА	дигидроксифенилаланин
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
ФОС	фосфорорганические инсектициды
АХЭ	ацетилхолинэстераза
АХ	ацетилхолин

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

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.

Алексеев, А. А. Изменение скорости гидролиза ювенильного гормона и уровня дофамина в гемолимфе гусениц пчелиной огневки *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera; Pyralidae) при микозе. / А. А. Алексеев, В. В. Серебров, О. Н. Гербер, М. А. Ушакова, Т. Н. Комарова, Н. А. Ченцова, И. Ю. Раушенбах // Доклады Академии наук. – 2007. – Т. 412, № 5. – С. 707–709.

Богомолова, Е. В. Влияние гонадотропинов на метаболизм дофамина у половозрелых самок дрозофилы. / Е. В. Богомолова, Н. В. Адоньева, А. А. Алексеев, Н. Е. Груntenко, И. Ю. Раушенбах // Доклады академии наук. – 2009. – Т. 427. – №. 2. – С. 257–259.

Борисов, Б. А. Энтмопатогенные 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.

Буров, В. Н. Состояние проблемы и перспективы химического метода защиты растений на пороге XXI века. / В. Н. Буров, В. И. Долженко, Г. И. Сухорученко, С. Л. Тютюрев // Вестник защиты растений. – 1999. – №. 1. – С. 89–105.

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.189-245.

Вейзер, Я. Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми. / Я. Вейзер. – М.: Колос, 1972. – 638 с.

Глулов, В.В. Механизмы резистентности насекомых / В.В. Глулов, С.А. Бахвалов, Ю.А. Соколова, И.А. Слепнева // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты под. ред. Глулова В.В. М.: Круглый год, – 2001. – С. 475–557.

Глулов, В. В. Генерация активированных кислородных метаболитов при формировании иммунного ответа у членистоногих. / В. В. Глулов, И. А. Слепнева, И. М. Дубовский // Труды Зоол. ин-та РАН. – 2009. – Т. 313. – №. 3. – С. 297-307.

Григорьева, Л. А. Особенности перитрофического матрикса в кишечнике самок клещей рода *Ixodes* (Acarina: Ixodidae). / Л. А. Григорьева, Л. И. Амосова // Паразитология. – 2004. – Vol. 38. – № 1. – Р. 3–11.

Груntenко, Н.Е. Стресс и размножение насекомых: гормональный контроль / Н.Е. Груntenко // Евразийский энтомологический журнал.– 2008. – Т 7. – Приложение 1.

Задорожный, О. Г. Природопользование при применении пестицидов в сельском хозяйстве Алтайского края. / О. Г. Задорожный, И. А. Суторихин // Ползуновский вестник. – 2005. – №. 4. – С. 142–147.

Кандыбин, Н.В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми. / Н.В. Кандыбин – М.: Агропромиздат, 1989. – 175 с.

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

Крюков, В.Ю. Синергетическое действие энтомопатогенных гифомицетов и бактерий *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* при инфицировании личинок

колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata*. / В. Ю. Крюков, В. П. Ходырев, О. Н. Ярославцева, А. С. Каменова Б. А. Дуйсембеков, В. В. Глупов // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45, № 5. – С. 571–576.

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.

Леви, Л. Эмоциональный стресс. / Л. Леви. – Л.: Медицина, 1970. –329 с

Мохамед, Э. Б. Перспективы повышения урожайности картофеля на основе применения инсектицидов. / Э. Б. Мохамед, Ш. Б. Байрамбеков, С. В. Екимов // Естественные науки, 2009. – Т. 28. – №. 3. – С. 65–68.

Огарков, Б.Н. Энтомопатогенные грибы Восточной Сибири. / Б.Н. Огарков, Г.Р. Огаркова Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 2000. –134 с.

Попова, Л. М. Химические средства защиты растений: учебное пособие / Л. М. Попова // СПбГТУРП. – СПб., 2009. – 96 с.

Тыщенко, В.П. Физиология насекомых. / В.П. Тыщенко – М.: Высшая школа, 1986. – 303с.

Шеперд, Г. Нейробиология: В 2 т. Т. 2. – М.:«Мир», 1987. – 368 с.

Штейнхаус, Э. Патология насекомых. / Э. Штейнхаус – М.: Изд-во иност.лит., 1952. – 840 с.

Штерншис, М.В. Биологическая защита растений. / М. В. Штерншис, Ф. С. Джалилов, И. В. Андреева, О. Г. Томилова – М.: Колос, 2004. – 264с.

Щербакова, Л. Н. Защита растений: учебное пособие для студентов учреждений среднего, профессионального образования / Л.Н.Щербакова, Н. Н. Карпун. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 272 с.

Эверли, Д. С. Стресс: природа и лечение. / Д. С. Эверли, Р. Розенфельд. – М. : Медицина, 1985. – Т. 224.

Adang, M. J. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. / M. J. Adang, N Crickmore, J. L. Jurat-Fuentes // *Advances in Insect Physiology*. – 2014. – Vol. 47. – P. 39–87.

Andersen, R. A. The effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on the feeding persistence of *Anopheles stephensi* Liston throughout the sporogonic cycle. / R. A. Andersen, J. C. Koellaf, H. Hurd // *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. – 1999. – Vol. 266. – №. 1430. – P. 1729–1733.

Andersen, S. O. Insect cuticular sclerotization: a review. / S. O. Andersen // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 2010. – Vol. 40. – P. 166-178.

Ansari, M. A. Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, control. / M. A. Ansari, F. A. Shah, T. M. Butt // *Entomologia Experimentalis et Applicata*. – 2008. – Vol. 129. – P. 340-347.

Ansari, M. A. The entomopathogenic nematode *Steinernema kraussei* and *Metarhizium anisopliae* work synergistically in controlling overwintering larvae of the black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, in strawberry growbags. / M. A. Ansari, F. A. Shah, T. M. Butt // *Biocontrol Science and Technology*. – 2010. – Vol. 20. – №. 1. – P. 99-105.

Armengol, G. Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. / G. Armengol, M. C. Escobar, M. E. Maldonado, S. Orduz // *Journal of applied microbiology*. – 2007. – Vol. 102. – P. 77–88.

Ashida, M. The prophenoloxidase activating system in crayfish. / M. Ashida, K. Soderhall // *Comparative Biochemistry and Physiology*. – 1984. – Vol. 77. – P 21–26.

Aubert, A. Social management of LPS-induced inflammation in *Formica polyctena* ants. / A. Aubert, F. J. Richard // Brain, behavior, and immunity. – 2008. – Vol. 22. – P. 833-837.

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.

Axelrod, J. Stress hormones: their interaction and regulation / J. Axelrod, T. D. Reisine // Science. – 1984.– Vol. 224. – № 4648. – P. 452–459.

Barwig, B. Evidence for presence of two clotting proteins in insects. / B. Barwig, H. Bohn // Naturwissenschaften. – 1980. – Vol. 67. – P. 47–48.

Behie, S. W. Endophytic insect–parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. / S. W. Behie, P. M. Zelisko, M. J. Bidochka // Science. – 2012. – Vol. 336. – P. 1576–1577.

Behie, S. W. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. / S. W. Behie, S. J. Jones, M. J. Bidochka // Fungal Ecology. – 2015. – Vol. 13. – P. 112–119.

Bellés, X. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. / X. Bellés, D. Martín, M. D. Piulachs // Annual Review of Entomology. – 2005. – Vol. 50. – P. 181-199.

Berger, J. Phagocytosis of insect haemocytes as a new alternative model. / J. Berger, M. Jurčová // Journal of Applied Biomedicine. – 2012. – Vol. 10. – №. 1. – P. 35–40.

Bernays, E. A. A study of tolerance of ingested tannin in *Schistocerca gregaria*. / E. A. Bernays, D. J. Chamberlain // Journal of Insect Physiology. – 1980. – Vol. 26. – №. 6. – P. 415–420.

Bernays, E. A. Plant tannins and insect herbivores: an appraisal. / E. A. Bernays // *Ecological Entomology*. – 1981. – Vol. 6. – №. 4. – P. 353–360.

Bernhard, K. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. / K. Bernhard, P. Jarrett, M. Meadows, J. Butt, D. J. Ellis, G. M. Roberts, S. Pauli, P. Rodgers, H. D. Burges // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1997. – Vol. 70. – P. 59–68.

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. A. De Croos // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – Vol. 67. – № 3. – P. 1335–1342.

Bidochka, M. J. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. / M. J. Bidochka, G. G. Khachatourians // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1990. – Vol. 56. – P. 362–370.

Bidochka, M. J. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. / M. J. Bidochka, G. G. Khachatourians // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1987. – Vol. 53. – №. 7. – P. 1679–1684.

Bidochka, M. J. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. / M. J. Bidochka, G. G. Khachatourians // *Experimental mycology*. – 1988. – Vol. 12. – P. 161–168.

Blenau, W. Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. / W. Blenau, A. Baumann // *Archives of insect biochemistry and physiology*. – 2001. – Vol. 48. – P. 13–38.

Bloch, G. Brain biogenic amines and reproductive dominance in bumble bees (*Bombus terrestris*). / G. Bloch, T. Simon, G. E. Robinson, A. Hefetz // Journal of Comparative Physiology A. – 2000. – Vol. 186. – P. 261-268.

Borovsky, D. Trypsin–modulating oostatic factor: a potential new larvicide for mosquito control. / D. Borovsky // Journal of experimental biology. – 2003. – Vol. 206. – P. 3869–3875.

Bradfish, G. A.  $\omega$ -conotoxin GVIA and nifedipine inhibit the depolarizing action of the fungal metabolite, destruxin B on muscle from the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). / G. A. Bradfish, S. L. Harmer // Toxicon. – 1990. – Vol. 28. – №. 11. – P. 1249–1254.

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. – Vol. 72. – P. 248–254.

Brandes, C. H. High–performance liquid chromatography (HPLC) measurement of catecholamines in single honeybee brains reveals caste–specific differences between worker bees and queens in *Apis mellifera*. / C. H. Brandes, M. Sugawa, R. Menzel // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology. – 1990. – Vol. 97. – №. 1. – P. 53–57.

Bravo, A. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. / A. Bravo, S. Likitvivanavong, S. S. Gill, M. Soberón // Insect biochemistry and molecular biology. – 2011). – Vol. 41. – P. 423-431.

Brivio, M. F. A pathogenic parasite interferes with phagocytosis of insect immunocompetent cells. / M. F. Brivio, M. Mastore, A. J. Nappi // Developmental & Comparative Immunology. – 2010. – Vol. 34. – №. 9. – P. 991–998.

Bulet, P. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. / P. Bulet, C. Hetru, J. L. Dimarcq, D. Hoffmann // Developmental & Comparative Immunology. – 1999. – Vol. 23. – №. 4. – P. 329–344.

Butt, T. M. *Metarhizium anisopliae* pathogenesis of mosquito larvae: a verdict of accidental death. / T. M. Butt, B. P. Greenfield, C. Greig, T. G. Maffei, J. W. 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. – Vol. 8. – № 12. – e81686.

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. – Vol. 52. – P. 81–89.

Cerenius, L. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. / L. Cerenius, K. Söderhäll // *Immunological reviews*. – 2004. – Vol. 198. – № 1. – P. 116–126.

Chen, Y. L. Biogenic amine levels change in the brains of stressed honeybees. / Y. L. Chen, Y. S. Hung, E. C. Yang // *Archives of insect biochemistry and physiology*. – 2008. – Vol. 68. – P. 241–250.

Chentsova, N. Stress response in *Drosophila melanogaster* strain inactive with decreased tyramine and octopamine contents. / N. Chentsova, N. Gruntenko, E. Bogomolova, N. Adonyeva, E. Karpova, I. Rauschenbach // *Journal of Comparative Physiology B*. – 2002. – Vol. 172. – P. 643–650.

Christensen, B. M. Melanization immune responses in mosquito vectors. / B. M. Christensen, J. Li, C. C. Chen, A. J. Nappi // *Trends in parasitology*. – 2005. – Vol. 21. – № 4. – P. 192–199.

Clark, K. D. Altered tyrosine metabolism and melanization complex formation underlie the developmental regulation of melanization in *Manduca sexta*. / K. D. Clark // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 2015. – Vol. 58. – P. 66–75.

Cory, J. S. Evolution and the microbial control of insects. / J. S. Cory, M. T. Franklin // *Evolutionary applications*. – 2012. – № 5. – P. 455–469.

Currie, C. R. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. / C. R. Currie, A. E. Stuart // Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. – 2001. – Vol. 268. – P. 1033-1039.

Cymborowski, B. Juvenile hormone titres and metabolism during starvation-induced supernumerary larval moulting of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. / B. Cymborowski, M. Bogus, N. E. Beckage, C. M. Williams, L. M. Riddiford // Journal of Insect Physiology. – 1982. – Vol. 28. – № 2. – P. 129–135.

Dai, J. I. D. A. Immunoreactivity of neurosecretory granules in the brain-retrocerebral complex of *Manduca sexta* to heterologous antibodies against Bombyx prothoracicotropic hormone and bombyxin. / J. I. D. A. Dai, A. Mizoguchi, L. I. Gilbert // Invertebrate Reproduction & Development. – 1994. – Vol. 26. – № 3. – P. 187–196.

Davenport, A. Stress-induced changes in the octopamine levels of insect haemolymph. / A. Davenport, P. Evans // Insect Biochemistry. – 1984. – Vol. 14. – № 2. – P. 135–143.

Diehl-Jones, W. L. Monoaminergic regulation of hemocyte activity. / W. L. Diehl-Jones, C. A. Mandato, G. Whent, R. G. Downer // Journal of Insect Physiology. – 1996. – Vol. 42. №. 1. – P. 13–19.

Djordjević, S. Effect of crude corpora cardiaca extracts on carbohydrate and lipid metabolism in larvae of the cerambycid beetle *Morimus funereus* as a function of diet and temperature. / S. Djordjević, V. Nenadović, J. Ivanović // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. – 1999. – Vol. 122. – P. 191-198.

Downer, R. G. H. The role of octopamine and cyclic AMP in regulating hormone release from corpora cardiaca of the american cockroach. / R. G. H. Downer, G. L. Orr, J. W. D. Gole, I. Orchard // Journal of insect physiology. – 1984. – Vol. 30. – №. 6. – P. 457–462.

Dubovskiy, I. M. Activity of the detoxificative enzyme system and encapsulation rate in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say) larvae under organophosphorous insecticide treatment and entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) infection. / I. M. Dubovskiy, V. Y. Kryukov, G. V Benkovskaya, O. N. Yaroslavtseva, E. V. Surina, V. V. Glupov // Euroasian Entomological Journal. – 2010. – Vol. 9. – № 4. – P. 577-582.

Dubovskiy, I. M. An increase in the immune system activity of the wax moth *Galleria mellonella* and of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* under effect of organophosphorus insecticide. / I. M. Dubovskiy, O. N. Yaroslavtseva, V. Y. Kryukov, G. V. Benkovskaya, V. V. Glupov // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2013b. – Vol. 49. – №.6. – P. 592-596.

Dubovskiy, I. M. More than a colour change: insect melanism, disease resistance and fecundity. / I. M. Dubovskiy, M. M. A. Whitten, V. Y. Kryukov, O. N. Yaroslavtseva, E. V. Grizanova, C. Greig, K. Mukherjee, A. Vilcinskas, P. V. Mitkovets, V. V. Glupov, T. M. Butt // Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. – 2013a. – 280.

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

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. Vol. 85. – P. 92–96.

Elekonich, M. M. Insect allatotropins belong to a family of structurally-related myoactive peptides present in several invertebrate phyla / M. M. Elekonich, F. M. Horodyski // Peptides. – 2003. – T. 24. – №. 10. – P. 1623–1632.

Evans, P. D. Biogenic amines in the insect nervous system. / P. D. Evans // *Adv Insect Physiol.* – 1980. – T. 15. – P. 317-473.

Even, N. General stress responses in the honey bee / N. Even, J. M. Devaud, A. B. Barron // *Insects.* – 2012. – Vol. 3. – № 4. – P. 1271–1298.

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. – Vol. 73. – № 1. – P. 295–302.

Fang, W. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. / W. Fang, B. Leng, Y. Xiao, K. Jin, J. Ma, Y. Fan, J. Feng, X. Yang, Y. Zhang, Y. Pei // *Applied and environmental microbiology.* – 2005. – Vol. 71. – № 1. – P. 363–370.

Farooqui, T. Octopamine-mediated neuromodulation of insect senses. / T. Farooqui // *Neurochemical research.* – 2007. – Vol. 32. – P. 1511–1529.

Feldhaar, H. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. / H. Feldhaar, R. Gross // *Microbes and Infection.* – 2008. – Vol. 10. – № 9. – P. 1082–1088.

Fuchs, S. Disruption of aminergic signalling reveals novel compounds with distinct inhibitory effects on mosquito reproduction, locomotor function and survival. / S. Fuchs, E. Rende, A. Crisanti, T. Nolan // *Scientific reports.* – 2014. – Vol. 4: 5526 . doi: 10.1038/srep05526.

Furlong, M.J. Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid, and cyromazine, Groden E. // *Journal of Economic Entomology.* – 2001. – Vol. 94. – № 2. – P. 344–356.

Gäde, G. Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control. / G. Gäde, G. J. Goldsworthy // *Pest Management Science*. – 2003. – Vol. 59. – P. 1063–1075.

Galloway, T. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. / T. Galloway, R. Handy // *Ecotoxicology*. – 2003. – Vol. 12. – P. 345–363.

Giglio, A. Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae): Cell types and their role in phagocytosis after in vivo artificial non-self-challenge. / A. Giglio, S. Battistella, F. F. Talarico, T. Z. Brandmayr, P. G. Giulianini. // *Micron*. – 2008. – Vol. 39. – P. 552–558.

Gilbert, L. I. Dynamic regulation of prothoracic gland ecdysteroidogenesis: *Manduca sexta* recombinant prothoracicotropic hormone and brain extracts have identical effects. / L. I. Gilbert, R. Rybczynski, Q. Song, A. Mizoguchi, R. Morreale, W. A. Smith, H. Matubayashi, M. Shionoya, S. Nagata, H. Kataoka // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 2000. – Vol. 30. – P. 1079–1089.

Gillespie, J. P. Characterization of the *Melanoplus sanguinipes* hemolymph after infection with *Beauveria bassiana* or wounding. / J. P. Gillespie, G. G. Khachatourians // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. – 1992. – Vol. 103. – №. 2. – P. 455–463.

Gillespie, J. P. Biological mediators of insect immunity. / J. P. Gillespie, M. R. Kanost, T. Trenczek // *Annual review of entomology*. – 1997. – Vol. 42. – №. 1. – P. 611–643.

Goettel, M. S. Pathogenesis of the hyphomycete *Tolypocladium cylindrosporum* in the mosquito *Aedes aegypti*. / M. S. Goettel // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1988. – Vol. 51. – P. 259–274.

Goldsworthy, G. J. Structures, assays and receptors for locust adipokinetic hormones. / G. J. Goldsworthy, M. J. Lee, R. Luswata, A. F. Drake, D. Hyde //

Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. – 1997. – Vol. 117. – №. 4. – P. 483-496.

González-Santoyo, I. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. / I. González-Santoyo, A. Córdoba-Aguilar // *Entomologia Experimentalis et Applicata*. – 2012. – Vol. 142. – №. 1. – P. 1–16.

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. – Vol. 119. – P. 40-46.

Gruntenko, N. E. Stress-reactivity and juvenile hormone degradation in *Drosophila melanogaster* strains having stress-related mutations. / N. E. Gruntenko, T. G. Wilson, M. Monastiriotti, I. Y. Rauschenbach // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 2000. – Vol. 30. – P. 775–783.

Gruntenko, N. The effect of mutations altering biogenic amine metabolism in *Drosophila* on viability and the response to environmental stresses. / N. Gruntenko, N. A. Chentsova, E. V. Bogomolova, E. K. Karpova, G. V. Glazko, N. V. Faddeeva, M. Monastiriotti, I. Y. Rauschenbach // *Archives of insect biochemistry and physiology*. – 2004. – Vol. 55. – P. 55-67.

Gruntenko, N. E. Juvenile hormone, 20-hydroxyecdysone and dopamine interaction in *Drosophila virilis* reproduction under normal and nutritional stress conditions. / N. E. Gruntenko, E. K. Karpova, N. V. Adonyeva, N. A. Chentsova, N. V. Faddeeva, A. A. Alekseev, I. Y. Rauschenbach // *Journal of insect physiology*. – 2005. – Vol. 51. – P. 417–425.

Gruntenko, N. E. Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction. / N. E. Gruntenko, I. Y. Rauschenbach // *Journal of insect physiology*. – 2008. – Vol. 54. – P. 902-908.

Gruntenko, N. E. Downregulation of the dopamine D2-like receptor in *corpus allatum* affects juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster* females. / N. E. Gruntenko, O. V. Laukhina, E. V. Bogomolova, E. K. Karpova, P. N. Menshanov, I. V. Romanova, I. Y. Rauschenbach // *Journal of insect physiology*. – 2012. – Vol. 58. – P. 348-355.

Gu, S. Temporal analysis of ecdysteroidogenic activity of the prothoracic glands during the fourth larval instar of the silkworm, *Bombyx mori*. / S. Gu, W. H. Tsia, Y. S. Chow // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 2000. – Vol. 30. – P 499–505.

Gupta, A. P. Immunology of Invertebrates: Cellular / *Encyclopedia Of Life Sciences*. Nature Publishing Group, 2001. P. 1–6.

Gupta, A. P. Immunology of Invertebrates: Humoral / *Encyclopedia Of Life Sciences*. Nature Publishing Group, 2001. P. 1–6.

Hajek, A. E. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. / A. E. Hajek, R. J. St. Leger // *Annual review of entomology*. – 1994. – Vol. 39. – P. 293–322.

Hansen, B. M. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. / B. M. Hansen, P. H. Damgaard, J. Eilenberg, J. C. Pedersen // *Journal of invertebrate pathology*. – 1998. – Vol. 71. – P. 106–114.

Harano, K. I. Influence of age and juvenile hormone on brain dopamine level in male honeybee (*Apis mellifera*): association with reproductive maturation. / K. I. Harano, K. Sasaki, T. Nagao, M. Sasaki // *Journal of insect physiology*. – 2008. – Vol. 54. – № 5. – P. 848–853.

Harris, J. W. Elevated brain dopamine levels associated with ovary development in queenless worker honey bees (*Apis mellifera* L.). / J. W. Harris, J. Woodring // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. – 1995. – Vol. 111. – №. 2. – P. 271–279.

Hasan, S. Entomopathogenic fungi as potent agents of biological control / S. Hasan // International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR). –2014. – Vol. 55. – P. 234–237.

Hilbeck, A. Another view on Bt proteins – how specific are they and what else might they do?/ A. Hilbeck, J.E.U. Schmidt // Biopesticides international. –2006. –Vol. 2. – P.1–50.

Hirashima, A. Chemical stress-induced changes in the biogenic amine levels of *Periplaneta americana* L. / A. Hirashima, M. Eto // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 1993. – Vol. 46. – P. 131-140.

Hirashima, A. Biogenic amines in *Drosophila virilis* under stress conditions. / A. Hirashima, M. J. Sukhanova, I. Y. Rauschenbach // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2000. – Vol. 64. – №. 12. – P. 2625-2630.

Hiruma, K. The molecular mechanisms of cuticular melanization: the ecdysone cascade leading to dopa decarboxylase expression in *Manduca sexta*. / K. Hiruma, L. M. Riddiford // Insect biochemistry and molecular biology. – 2009. – Vol. 39. – P. 245-253.

Hoffmann, J. A. Innate immunity of insects / J. A. Hoffmann // Current opinion in immunology. – 1995. – Vol. 7. – №. 1. – P. 4–10.

Hoffmann, J. A. Innate immunity in higher insects. / J. A. Hoffmann, J. M. Reichhart, C. Hetru // Current opinion in immunology. – 1996. – Vol. 8. – №. 1. – P. 8–13.

Hoffmann, K. H. Allatostatins and allatotropins: is the regulation of corpora allata activity their primary function? / K. H. Hoffmann, M. Meyerinng–Vos, M. W. Lorenz // European Journal of Entomology. – 1999. – Vol. 96. – P. 255–266.

Hung, S. Y. Phenoxidase activity in hemolymph of naive and *Beauveria bassiana*-infected *Spodoptera exigua* larvae. / S. Y. Hung, D. G. Boucias // Journal of Invertebrate Pathology. – 1996. – Vol. 67. – P. 35-40.

Ilijin, L. The influence of dietary protein quality on midgut and brain proteins in *Morimus funereus* larvae. / L. Ilijin, M. Janković–Tomanić, M. Mrdaković, M. Vlahović, V. Perić–Mataruga, J. Lazarević, V. Nenadović // Archives of Biological Sciences. – 2004. – Vol. 56. – № 1–2. – P. 9–13.

Ilijin, L. Temperature–induced stress response in *Lymantria dispar* neurosecretory neurons. / L. Ilijin, M. Vlahović, V. Perić–Mataruga, I. Kmetič, A. Gavrilović, D. Matic, M. Mrdaković // Turkish Journal of Biology. – 2014. – Vol. 38. – P 157–167.

Ivanović, J. P. Possible role of neurosecretory cells: type A in response of *Morimus funereus* larvae to the effect of temperature / J. P. Ivanović, M. I. Janković–Hladni, M. P. Milanović // Journal of Thermal Biology. – 1975. – Vol. 1. – № 1. – P. 53–57.

Ivanović, J. Possible role of neurohormones in the process of acclimatization and acclimation in *Morimus funereus* larvae (insecta)–I. changes in the neuroendocrine system and target organs (midgut, haemolymph) during the annual cycle / J. Ivanović, M. Janković–Hladni, V. Stanić, M. Milanović, V. Nenadović // Comparative Biochemistry and Physiology. – 1979. – Vol. 63A. – P. 95–102.

Ivanović, J. Differences in the sensitivity of protocerebral neurosecretory cells arising from the effect of different factors in *Morimus funereus* larvae. / J. Ivanović, M. Janković–Hladni, V. Stanić, D. Kalafatić. // Comparative Biochemistry and Physiology. – 1985. – Vol. 80A. – № 1. – P.107–113.

Ivanović, J. The role of neurosecretion and metabolism in development of an oligophagous feeding habit in *Morimus funereus* larvae (Col., Cerambycidae). / J. Ivanović, M. Janković–Hladni, V. Stanić, V. Nenadović, M. Fnusić // Comparative Biochemistry and Physiology. – 1989. – Vol. 94A. – № 1. – P.167–171.

Iwanaga, S. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. / S. Iwanaga, S. Kawabata, T. Muta // Journal of biochemistry. – 1998. – Vol. 123. – №. 1. – P. 1–15.

Jackson, D. M. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. / D. M. Jackson, A. Westlind–Danielsson // *Pharmacology & therapeutics*. – 1994. – Vol. 64. – №. 2. – P. 291–370.

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. – Vol. 84. – №. 2. – P. 67–74.

Janković–Hladni, M. The selective response of the protocerebral neurosecretory cells of the *Cerambyx cerdo* larvae to the effect of different factors. / M. Janković–Hladni, J. Ivanović, V. Nenadović, V. Stanić // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. – 1983. – Vol. 74. – № 1. – P. 131–136.

Janović-Hladni, M. Effects of diet and temperature on *Morimus funereus* larval hemolymph cation concentrations. / M. Janović-Hladni, A. C. Chen, J. Ivanović, S. Djordjević, V. Stanić, V. Perić, M. Frusić // *Archives of insect biochemistry and physiology*. – 1992. – Vol. 20. – № 3. – P. 205–214.

Johansson, M. W. Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. / M. W. Johansson // *Developmental & Comparative Immunology*. – 1999. – Vol. 23. – №. 4. – P. 303–315.

Johnson, E.C. Stressed–Out Insects: hormonal actions and behavioral modifications. / E.C. Johnson, M.P. White // *Hormones, brain and behavior*. – Academic Press: San Diego, CA, USA, 2009. – P. 1069–1096.

Jones, G. The role of juvenile hormone esterase in terminating larval feeding and initiating metamorphic development in *Trichoplusia ni* / G. Jones // *Entomologia experimentalis et applicata*. – 1985. – Vol. 39. – P. 171–176.

Kato, N. Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. / N. Kato, C. R.

Mueller, J. F. Fuchs, V. Wessely, Q. Lan, B. M. Christensen // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 2006. – Vol. 36. – P. 1–9.

Kavanagh, K. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens / K. Kavanagh, E. P. Reeves // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2004. – Vol. 28. – P.101–112.

Kedra, E. The influence of *Conidiobolus coronatus* on phagocytic activity of insect hemocytes. / E. Kedra, M. I. Boguś // *Journal of invertebrate pathology*. – 2006. – Vol. 91. – №. 1. – P. 50–52.

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.

Kim, M. H. Bacterial-injection-induced syntheses of N- $\beta$ -alanyldopamine and Dopa decarboxylase in the hemolymph of coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae. / M. H. Kim, C. H. Joo, M. Y. Cho, T. H. Kwon, K. M. Lee, S. Natori, T. H. Lee, B. L. Lee // *European Journal of Biochemistry*. – 2000. – Vol. 267. – P. 2599–2608.

Kozanek, M. Influence of social stress on monoamine concentration in the central nervous system of the cockroach *Nauphoeta cinerea* (Blattodea). / M. Kozanek, M. Jurani, E. Somogyiova // *Acta entomologica bohemoslovaca*. – 1986. – Vol. 83– №. 3. – P. 171–178.

Koella, J. C. The malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, *Anopheles gambiae*. / J. C. Koella, F. L. Sorensen, R. A. Anderson // *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. – 1998. – Vol. 265. – №. 1398. – P. 763–768.

Koella, J. C. Stage-specific manipulation of a mosquito's host-seeking behavior by the malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* / J. C. Koella, L. Rieu, R. E. L. Paul // *Behavioral Ecology*. – 2002. – Vol. 13. – №. 6. – P. 816–820.

Kong, H. Density-dependent prophylaxis in crowded Beet Webworm, *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae to a parasitoid and a fungal pathogen. / H. Kong, Y. Cheng, L. Luo, T. W. Sappington, X. Jiang, L. Zhang // International Journal of Pest Management. – 2013. – Vol. 59. – №. 3. – P. 174-179.

Kou, R. Allatotropic and nervous control of corpora allata in the adult male *loreyi* leafworm, *Mythimna loreyi* (Lepidoptera: Noctuidae) / R. Kou, S. J. Chen // Physiological Entomology. – 2000. – Vol. 25. – P. 273–280.

Kryukova, N. A. Concentration of cytosolic calcium in hemocytes of the greater wax moth larvae *Galleria mellonella* during the cellular immune response. / N. A. Kryukova, I. M. Dubovskiy, C. A. Chertkova, C. V. Grizanova, V.V.Glupov. // Euroasian Entomological Journal. – 2013. – Vol. 12. – № 5. – P. 421–424

Kryukov, V. Y. Insecticidal and immunosuppressive effect of ascomycete *Cordyceps militaris* on the larvae of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. / V. Y. Kryukov, O. N. Yaroslavtseva, I. M. Dubovskiy, M. V. Tyurin, N. A. Kryukova, Glupov, V. V. // Biology Bulletin. – 2014. – Vol. 41. – №. 3. – P. 276-283.

Kryukov, V. Y. Immune reactions of the greater wax moth, *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera, pyralidae) larvae under combined treatment of the entomopathogens *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Link and *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.(Ascomycota, Hypocreales). / V. Y. Kryukov, O. N. Yaroslavtseva, E. V. Surina, M. V. Tyurin, I. M Dubovskiy, V. V. Glupov // Entomological Review. – 2015. – Vol. 95. – №. 6. – P. 693-698.

Kume, K. Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. / K. Kume, S. Kume, S. K. Park, J. Hirsh, F. R. Jackson // The Journal of neuroscience. – 2005. – Vol. 25. – № 32. – P. 7377–7384.

Kuraishi, T. Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. / T. Kuraishi, O. Binggeli, O.

Opota, N. Buchon, B. Lemaitre // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – Vol. 108. – № 38. – P. 15966–15971.

Kurata, S. Recognition and elimination of diversified pathogens in insect defense systems. / S. Kurata // Molecular diversity. – 2006. – Vol. 10. – №. 4. – P. 599–605.

Lavine, M. D. Insect hemocytes and their role in immunity. / M. D. Lavine, M. R. Strand // Insect biochemistry and molecular biology. – 2002. – Vol. 32. – №. 10. – P. 1295–1309.

Lavine, M. D. Haemocytes from *Pseudoplusia includens* express multiple  $\alpha$  and  $\beta$  integrin subunits. / M. D. Lavine, M. R. Strand // Insect molecular biology. – 2003. – Vol. 12. – №. 5. – P. 441–452.

Lawniczak, M. K. Mating and immunity in invertebrates. / M. K. Lawniczak, A. I. Barnes, J. R. Linklater, J. M. Boone, S. Wigby, T. Chapman // Trends in Ecology & Evolution. – 2006. – Vol. 22. – №. 1. – P. 48-55.

Lehane, M. J. Peritrophic matrix structure and function. / M. J. Lehane // Annual review of entomology. – 1997. – Vol. 42. – P. 525–550.

Lekovic, S. The effect of heat stress on the activity of A1 and A2 neurosecretory neurons of *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. / S. Lekovic, J. Lazarevic, V. Nenadovic, J. Ivanovic // European Journal of Entomology. – 2001. – Vol. 98. – № 1. – P. 13–18.

Levri, E. P. Parasite-induced change in host behavior of a freshwater snail: parasitic manipulation or byproduct of infection? / E. P. Levri // Behavioral Ecology. – 1999. – Vol. 10. – №. 3. – P. 234–241.

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. – Vol. 32. – № 8. – P. 919–928.

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. – Vol. 52. – P. 231–253.

Libersat, F. Wasp uses venom cocktail to manipulate the behavior of its cockroach prey. / F. Libersat // Journal of Comparative Physiology A. – 2003. – Vol. 189. – P. 497-508.

Libersat, F. Manipulation of host behavior by parasitic insects and insect parasites. / F. Libersat, A. Delago, R. Gal // Annual review of entomology. – 2009. – Vol. 54. – P. 189-207.

Libersat, F. What can parasitoid wasps teach us about decision-making in insects? / F. Libersat, R. Gal // The Journal of experimental biology. – 2013. – Vol. 216. – №. 1. – P. 47-55.

Libersat, F. Wasp voodoo rituals, venom-cocktails, and the zombification of cockroach hosts. / F. Libersat, R. Gal // Integrative and comparative biology. – 2014. doi:10.1093/icb/icu006 – P. 1–14.

Ling, E. Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. / E. Ling, X. Q. Yu // Insect biochemistry and molecular biology. – 2005. – Vol. 35. – №. 12. – P. 1356-1366.

Logan, N. A. Bacillus and relatives in foodborne illness. / N. A. Logan // Journal of applied microbiology. – 2012. – Vol. 112. – №. 3. – P. 417–429.

Lopez–Perez, M. Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid–state culture: current status and future perspectives. / M. Lopez–Perez, D. Rodriguez–Gomez, O. Loera // Critical reviews in biotechnology. – 2014. – P. 1–8.

Lowenberger, C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. / C. Lowenberger // Insect biochemistry and molecular biology. – 2001. – Vol. 31. – №. 3. – P. 219–229.

Maagd, R. A. *Bacillus thuringiensis*-based products for insect pest control. / R. A. Maagd // *Principles of Plant-Microbe Interactions*. – Springer International Publishing, 2015. – P. 185–192.

Maduell, P. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane of species of *Piper* (Piperaceae) in three altitudinal levels. / P. Maduell, R. Callejas, K. R. Cabrera, G. Armengol, S. Orduz // *Microbial ecology*. – 2002. – Vol. 44. – P. 144–153.

Mak, P. A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. / P. Mak, A. Zdybicka-Barabas, M. Cytryńska // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2010. – Vol. 34. – №. 10. – P. 1129–1136.

Malá, J. Effects of starvation, chilling, and injury on endocrine gland function in *Galleria mellonella*. / J. Malá, F. Sehnal, A. K. Kumaran, N. A. Granger // *Archives of insect biochemistry and physiology*. – 1987. – Vol. 4. – P. 113–128.

Mamidala, P. Metabolic resistance in bed bugs. / P. Mamidala, S. C. Jones, O. Mittapalli // *Insects*. – 2011. – Vol. 2. – №. 1. – P. 36–48.

Marmaras, V. J. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. / V. J. Marmaras, M. Lampropoulou // *Cellular signalling*. – 2009. – Vol. 21. – P. 186–195.

Matthews, J. R. Hyperglycaemia induced by anaesthesia in the american cockroach, *Periplaneta americana* L. / J. R. Matthews, R. G. H. Downer // *Canadian Journal of Zoology*. – 1973. – Vol. 51. – №. 3. – P. 395–397.

Ment, D. *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface. / D. Ment, G. Gindin, V. Soroker, I. Glazer, A. Rot, M. Samish // *Journal of invertebrate pathology*. – 2010. – Vol. 103. – №. 2 – P. 132–139.

Meyling, N. V. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation

biological control. / N. V. Meyling, J. Eilenberg // *Biological control*. – 2007. – Vol. 43. – P. 145–155.

Milde, J. J. Adipokinetic hormone stimulates neurones in the insect central nervous system. / J. J. Milde, R. Ziegler, M. Wallstein // *The Journal of experimental biology*. – 1995. – Vol. 198. – P. 1307-1311

Mizoguchi, A. Developmental profile of the changes in the prothoracicotropic hormone titer in hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*: correlation with ecdysteroid secretion. / A. Mizoguchi, Y. Ohashi, K. Hosoda, J. Ishibashi, H. Kataoka // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 2001. – Vol. 31. – P 349– 358.

Mizoguchi, A. Basic pattern of fluctuation in hemolymph PTTH titers during larval–pupal and pupal–adult development of the silkworm, *Bombyx mori* / A. Mizoguchi, S. G. Dedos, H. Fugo, H. Kataoka // *General and comparative endocrinology*. – 2002. – Vol.127. – P 181–189.

Moreira, L. A. The wMelPop strain of *Wolbachia* interferes with dopamine levels in *Aedes aegypti* / L. A. Moreira, Y. H. Ye, K. Turner, D. W. Eyles, E.A. McGraw, S. L. O’Neill // *Parasites & Vectors*. – 2011. – Vol. 4. – P. 28.

Mrdaković, M. The response of medial neurosecretory neurons to temperature stress in *Morimus funereus* larvae. / M. Mrdaković, L. A. Ilijin, M. S. Vlahović, M. Janković–Tomanić, V. Perić–Mataruga, J. Lazarević, Z. Prolic, V. Nenadović // *Archives of Biological Sciences*. – 2004.– Vol. 56. – № 3–4. – P. 19–20.

Mrdaković–Mitić, M. M. The effects of different constant temperatures on the activity of corpora allata in *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. / M. M. Mrdaković–Mitić, L. A. Ilijin, M. Vlahović, M. Ž. Janković–Tomanić, V. D. Perić–Mataruga, J. M Lazarević, V. A. Nenadović // *Archives of Biological Sciences*. – 2003. – Vol. 55. – № 3–4. – P. 21–22.

Nappi, A. J. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. / A. J. Nappi, E. Ottaviani // *Bioessays*. – 2000. – Vol. 22. – №. 5. – P. 469–480.

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. – Vol. 35. – №. 5. – P. 443-459

Nappi, A. The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. / A. Nappi, M. Poirié, Y. Carton // *Advances in parasitology*. – 2009. – Vol. 70. – P. 99–121.

Nässel, D. R. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones / D. R. Nässel // *Progress in neurobiology*. – 2002. – Vol. 68. – P. 1–84.

Neckameyer, W. S. Dopamine and senescence in *Drosophila melanogaster*. / W. S. Neckameyer, S. Woodrome, B. Holt, A. Mayer // *Neurobiology of aging*. – 2000. – Vol. 21. – № 1. – P. 145–152.

Neckameyer, W. Dopamine and sensory tissue development in *Drosophila melanogaster*. / W. Neckameyer, J. O'Donnell, Z. Huang, W. Stark // *Journal of neurobiology*. – 2001. – Vol. 47. – № 4. – P. 280–294.

Neckameyer, W. S. Stress affects dopaminergic signaling pathways in *Drosophila melanogaster*. / W. S. Neckameyer, J. S. Weinstein // *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*. – 2005. – Vol. 8. – №. 2. – P. 117-131.

Nenadović, Temperature and magnetic field effects on the activity of protocerebral neurosecretory neurons and corpora allata in *Cerambyx cerdo* L. larvae. / V. Nenadović, M. Mrdaković, J. Lazarević, D. Mirčić, D. Todorović, Z. Prolić, // *Archives of Biological Sciences*. – 2005. – Vol. 57. – № 1. – P. 19–24.

Nenadović, V. Activity of lateral peptidergic neurosecretory neurons of the *Morimus funereus* protocerebrum during the intermolt period. / V. Nenadović, M. Mrdaković, J. Lazarević, V. Perić–Mataruga, L. Ilijin // *Archives of Biological Sciences*. – 2006. – Vol. 58. – № 1. – P. 3–4.

Nijhout, H. F. Stretch-induced moulting in *Oncopeltus fasciatus* / H. F. Nijhout // Journal of insect physiology. – 1979. – Vol. 25. – P. 277–281

Noguchi, H. Elevation of dopamine levels in parasitized insect larvae. / H. Noguchi, Y. Hayakawa, R. G. H. Downer // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 1995. – Vol. 25. – №. 2. – P. 197-201.

Ohba, M. Bacillus thuringiensis diversity in soil and phylloplane. / M. Ohba // Endospore-forming Soil Bacteria. – Springer Berlin Heidelberg, 2011. – P. 215–233.

Omelyanchuk, L. V. Regulatory gene for phenoloxidase activity in *Drosophila melanogaster*. / L. V. Omelyanchuk, I. M. Dubovski, V. V. Glupov A // Russian Journal of Genetics. – 2001. – Vol. 37. – №. 8. – P. 884-887.

Orchard, I. Octopamine in insects: neurotransmitter, neurohormone, and neuromodulator / I. Orchard // Canadian Journal of Zoology. – 1982. – Vol. 60. – № 4. – P. 659–669.

Orchard, I. A multifunctional role for octopamine in locust flight. / I. Orchard, J. M. Ramirez, A. B. Lange // Annual review of entomology. – 1993. – Vol. 38. – P. 227-249.

Ownley, B. H. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. / B. H. Ownley, K. D. Gwinn, F. E. Vega // The ecology of fungal entomopathogens. – Springer Netherlands, 2010. – P. 113–128.

Passier, P. C. C. M. Modulatory effects of biogenic amines on adipokinetic hormone secretion from locust corpora cardiaca in vitro. / P. C. C. M. Passier, H. G. B. Vullings, J. H. B. Diederer, D. J. Van der Horst // General and comparative endocrinology. – 1995. – Vol. 97. – P. 231–238.

Pendleton, R. G. Effects of adrenergic agents on locomotor behavior and reproductive development in *Drosophila*. / R. G. Pendleton, A. Rasheed, R. Hillman // Drug development research. – 2000. – Vol. 50. – №. 2. – P. 142–146.

Pendleton, R. G. Effects of tyrosine hydroxylase mutants on locomotor activity in *Drosophila*: a study in functional genomics. / R. G. Pendleton, A. Rasheed, T. Sardina, T. Tully, R. Hillman // *Behavior genetics*. – 2002. – Vol. 32. – № 2. – P. 89–94.

Perić–Mataruga, V. Effect of the host plant on the antioxidative defence in the midgut of *Lymantria dispar* L. caterpillars of different population origins. / V. Perić–Mataruga, D. Blagojević, M. B. Spasić, J. Ivanović, M. Janković–Hladni // *Journal of Insect Physiology*. – 1997. – Vol. 43. – № 1. – P. 101–106.

Perić–Mataruga, V. A possible role for the dorsolateral protocerebral neurosecretory neurons in the trophic adaptations of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). / V. Perić–Mataruga, J. Lazarević, V. Nenadović // *European Journal of Entomology*. – 2001. – Vol. 98. – P. 257–264.

Perić–Mataruga, V. Neurohormones in insect stress: a review. / V. Perić–Mataruga, V. Nenadović, J. Ivanović // *Archives of Biological Sciences*. – 2006. – Vol. 58. – № 1. – P. 1–12.

Perry, A. S. Insecticides in agriculture and environment: retrospects and prospects. / A. S. Perry, I. Yamamoto, I. Ishaaya, R. Y. Perry // Springer–Verlag Berlin Heidelberg – 1998. – 274 pp.

Pietrantonio, P. V. *Bacillus thuringiensis* endotoxins: action on the insect midgut. / P. V. Pietrantonio, S. S. Gill // *Biology of the insect midgut*. – Springer Netherlands, 1996. – P. 345–372.

Plymale, R. Plant–mediated alteration of the peritrophic matrix and baculovirus infection in lepidopteran larvae. / R. Plymale, M. J. Grove, D. Cox–Foster, N. Ostiguy, K. Hoover // *Journal of insect physiology*. – 2008. – Vol. 54. – P. 737–749.

Pope, C. N. Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity? / C. N. Pope // *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*. – 1999. – Vol. 2. – P. 161–181.

Portugal, L. Toxicity and mode of action of insecticidal Cry1A proteins from *Bacillus thuringiensis* in an insect cell line, CF-1. / L. Portugal, J. L. Gringorten, G. F. Caputo, M. Soberón, C. Munoz-Garay, A. Bravo // *Peptides*. – 2014. – Vol. 53. – P. 292-299.

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. – Vol. 161. – P. 38–42.

Raabe, M. The neurosecretory–neurohaemal system of insects; anatomical, structural and physiological data / M. Raabe // *Advances in insect physiology*. – 1983. – Vol. 17. – P. 205–303.

Rahman, M. M. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. / M. M. Rahman, H. L. Roberts, M. Sarjan, S. Asgari, O. Schmidt // *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101. – № 9. – 2696–2699.

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. – Vol. 19. – P. 834–843.

Ratcliffe, N. A. Studies on the in vivo cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. / N. A. Ratcliffe, S. J. Gagen // *Tissue and Cell*. – 1977. – Vol. 9. – № 1. – P. 73–85.

Ratcliffe, N. A. Invertebrate immunity—a primer for the non–specialist. / N. A. Ratcliffe // *Immunology letters*. – 1985. – Vol. 10. – № 5. – P. 253–270.

Rauschenbach, I. Y. Stress–like reaction of *Drosophila* to adverse environmental factors. / I. Y. Rauschenbach, N. S. Lukashina, L. F. Maksimovsky, L. I. Korochkin // *Journal of Comparative Physiology B*. – 1987. – Vol. 157. – P. 519–531.

Rauschenbach, I. Y. Analysis of differences in dopamine content between two lines of *Drosophila virilis* in response to heat stress. / I. Y. Rauschenbach, L. I. Serova, I. S. Timochina, N. A. Chentsova, L. V. Schumnaja // Journal of Insect Physiology. – 1993. – Vol. 39. – № 9. – P. 761–767.

Rauschenbach, I. Y. Metabolism of the juvenile hormone in *Drosophila* adults under normal conditions and heat stress: Genetical and biochemical aspects. / I. Y. Rauschenbach, T. M. Khlebodarova, N. A. Chentsova, N. E. Gruntenko, L. G. Grenback, E. I. Yantsen, M. L. Filipenko // Journal of insect physiology. – 1995. – Vol. 41. – № 2. – P. 179–189.

Rauschenbach, I. Y. The role of the degradation system of the juvenile hormone in the reproduction of *Drosophila* under stress. / I. Y. Rauschenbach, N. E. Gruntenko, T. M. Khlebodarova, M. M. Mazurov, L. G. Grenback, M. J. Sukhanova, L. V. Shumnaja, K. Zakharov, B. D. Hammock // Journal of insect physiology. – 1996. – Vol. 42. – № 8. – P. 735–742.

Rauschenbach, I. Y. Regulation of reproductive function in *Drosophila* females due to hormonal interaction under stress is genetically determined. / I. Y. Rauschenbach, N. E. Gruntenko, N. S. Chentsova, A. Hirashima, M. Z. Sukhanova, E. V. Andreenkova, G. V. Glazko // Russian Journal of Genetics. – 2001. – Vol. 37. – № 9. – P. 1041–1048.

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. – P. 189–194.

Roberts, D. W. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect–pathogenic fungi: mycological aspects. / D. W. Roberts, R. J. S. Leger // Advances in applied microbiology. – 2004. – Vol. 54. – P. 1–70.

Rojas, J. M. Altered dopamine levels induced by the parasite *Proflicollis antarcticus* on its intermediate host, the crab *Hemigrapsus crenulatus*. / J. M. Rojas, F. P. Ojeda // Biological research. – 2005. – Vol. 38. – P. 259–266.

Rosales, C. Phagocytosis, a cellular immune response in insects. / C. Rosales // ISJ. – 2011. – Vol. 8. – P. 109–131.

Roy, H. E. Interactions between the fungal pathogen *Beauveria bassiana* and three species of coccinellid: *Harmonia axyridis*, *Coccinella septempunctata* and *Adalia bipunctata*. / H. E. Roy, P. M. Brown, P. Rothery, R. L. Ware, M. E. Majerus // BioControl. – 2008. – Vol. 53. – P. 265–276.

Rybczynski, R. Prothoracicotropic hormone stimulated extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity: the changing roles of Ca<sup>2+</sup> and cAMP-dependent mechanisms in the insect prothoracic glands during metamorphosis. / R. Rybczynski, L. I. Gilbert // Molecular and cellular endocrinology. – 2003. – Vol. 205. – P. 159–168.

Samuels, R. I. The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. / R. I. Samuels, A. K. Charnley, S. E. Reynolds // Mycopathologia. – 1988. – Vol. 104. – P. 51–58.

Sasaki, K. Distribution and levels of dopamine and its metabolites in brains of reproductive workers in honeybees. / K. Sasaki, T. Nagao // Journal of Insect Physiology. – 2001. – Vol. 47. – №. 10. – P. 1205–1216.

Sasaki, K. Neuro-endocrine correlates of ovarian development and egg-laying behaviors in the primitively eusocial wasp (*Polistes chinensis*). / K. Sasaki, K. Yamasaki, T. Nagao // Journal of insect physiology. – 2007. – Vol. 53. – P. 940–949.

Satyavathi, V. V. Nodulation: An unexplored cellular defense mechanism in insects / V. V. Satyavathi, A. Minz, J. Nagaraju // Cellular Signalling. – 2014. – Vol. 26. – P. 1753–1763.

Schnepf, E. Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. / E. Schnepf, N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, D. H. Dean // Microbiology and molecular biology reviews. – 1998. – Vol. 62. – № 3. – P. 775–806.

Schooneveld, H. Adipokinetic hormone and AKH-like peptide demonstrated in the corpora cardiaca and nervous system of *Locusta migratoria* by immunocytochemistry. /

H. Schooneveld, G. I. Tesser, J. A. Veenstra, H. M. Romberg-Privee // Cell and tissue research. – 1983. – Vol. 230. – P. 67–76.

Sehnal, F. Midgut endocrine cells. / F. Sehnal, D. Žitňan // Biology of the insect midgut. – Springer Netherlands, – 1996. – P. 55–85.

Selye, H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions / H. Selye // Canadian medical association journal. – 1976. – Vol. 115. – P. 53–56.

Semenova, A. D. Quantitative determination of nitric oxide production in haemocytes: nitrite reduction activity as a potential pathway of NO formation in haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. / A. D. Semenova, Y. I. Glazachev, I. A. Slepneva, V. V. Glupov // Nitric Oxide. – 2014. – Vol. 37. – P. 46-52.

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. – Vol. 44. – № 3. – P. 236–239.

Shah, F. A. Evaluation of black vine weevil (*Otiiorhynchus sulcatus*) control strategies using *Metarhizium anisopliae* with sublethal doses of insecticides in disparate horticultural growing media. / F. A. Shah, M. A. Ansari, M. Prasad, T. M. Butt // Biological Control. – 2007. – Vol. 40. – P. 246-252.

Shi, X. Modeling the structure of the type I peritrophic matrix: characterization of a *Mamestra configurata* intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains. / X. Shi, M. Chamankhah, S. Visal-Shah, S. M. Hemmingsen, M. Erlandson, L. Braun, M. Alting-Mees, G. G. Khachatourians, M. O'Grady, D. D. Hegedus // Insect biochemistry and molecular biology. – 2004. – Vol. 34. – P. 1101–1115.

Shisa, N. Unusual envelopes associated with parasporal inclusions of a mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* serovar *fukuokaensis* isolate. / N. Shisa, M. Maeda, M. Ohba // Journal of basic microbiology. – 2006. – Vol. 46. – №. 1. – P. 64–67.

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*. – 2007. – Vol. 123. – P. 528-537.

Siva-Jothy, M. T. Insect immunity: an evolutionary ecology perspective. / M. T. Siva-Jothy, Y. Moret, J. Rolff // *Advances in insect physiology*. – 2005. – Vol. 32. – P. 1–48.

Socha, R. Adipokinetic hormone stimulates insect locomotor activity. / R. Socha, D. Kodrík, R. Zemek // *Naturwissenschaften*. – 1999. – Vol. 86. – P. 85-86.

Söderhäll, K. Effect of quinones and melanin on mycelial growth of *Aphanomyces* spp. and extracellular protease of *Aphanomyces astaci*, a parasite on crayfish. / K. Söderhäll, R. Ajaxon // *Journal of invertebrate pathology*. – 1982. – Vol. 39. – №. 1. – P. 105–109.

Söderhäll, K. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. / K. Söderhäll, L. Cerenius // *Current opinion in immunology*. – 1998. – Vol. 10. – №. 1. – P. 23–28.

Staves, P. A. Virulence and competitiveness: testing the relationship during inter- and intraspecific mixed infections. / P. A. Staves, R. J. Knell // *Evolution*. – 2010. – T. 64. – №. 9. – C. 2643-2652.

Stay, B. A review of the role of neurosecretion in the control of juvenile hormone synthesis: a tribute to Berta Scharrer / B. Stay // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 2000. – Vol. 30. – P. 653–662.

Stevenson, P. A. Localization of octopaminergic neurones in insects. / P. A. Stevenson, U. Spörhase-Eichmann // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. – 1995. – Vol. 110. – №. 3. – P. 203-215.

Stuart, L. M. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. / L. M. Stuart, R. A. Ezekowitz // *Nature Reviews Immunology*. – 2008. – Vol. 8. – P. 131–141.

Subrahmanyam, B. The alteration of juvenile hormone titre in *Spodoptera litura* (F.) due to a baculovirus infection. / B. Subrahmanyam, N. Ramakrishnan // *Experientia*. – 1980. – Vol. 36. – P 471–472.

Sugumaran, M. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. / M. Sugumaran // *Pigment Cell Research*. – 2002. – Vol. 15. – №. 1. – P. 2–9.

Sujeetha, J. A. R.P. Role of entomopathogenic fungus in pest management/ J. A. R.P. Sujeetha, K. Sahayaraj // *Basic and Applied Aspects of Biopesticides*. – 2014. Springer India,– P. 31–46.

Székács, A. Comparative aspects of Cry toxin usage in insect control. / A. Székács, B. Darvas // *Advanced Technologies for Managing Insect Pests*. – Springer Netherlands, 2012. – P. 195–230.

Tang, H. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. / H. Tang // *Fly*. – 2009. – Vol. 3. – №. 1. – P. 105–111.

Tellam, R. L. The peritrophic matrix. / R. L. Tellam // *Biology of the insect midgut*. – Springer Netherlands, – 1996. – P. 86–114.

Theopold, U. The coagulation of insect hemolymph. / U. Theopold, D. Li, M. Fabbri, C. Scherfer, O. Schmidt. // *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. – 2002. – Vol. 59. – № 2. – P. 363–372.

Theopold, U. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. / U. Theopold, O. Schmidt, K. Söderhäll, M. S. Dushay // *Trends in immunology*. – 2004. – Vol. 25. – №. 6. – P. 289–294.

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. – Vol. 29. – № 5. – P. 1041–1047.

Tounou, A. K. Combined field efficacy of *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for the control of sahelian grasshoppers. / A. K. Tounou, C. Kooyman, O. K. Douro-Kpindou, H. M. Poehling // *BioControl*. – 2008. – Vol. 53. – P. 813-828.

Truman J. W. Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. / J. W. Truman, L. M. Riddiford // *Annual review of entomology*. – 2002. – Vol. 47. – P. 467-500.

Tu, M. P. Allatotropic activity in the brain of female *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae) / M. P. Tu, R. Kou, G. O'Remus, C. M. Yin, J. G. Stoffolano // *Journal of insect physiology*. – 2002. – Vol. 48. – P 733–741.

Tzou, P. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host–pathogen interactions. / P. Tzou, E. De Gregorio, B. Lemaitre // *Current opinion in microbiology*. – 2002. – Vol. 5. – P. 102-110.

Unoki, S. Participation of octopaminergic reward system and dopaminergic punishment system in insect olfactory learning revealed by pharmacological study. / S. Unoki, Y. Matsumoto, M. Mizunami // *European Journal of Neuroscience*. – 2005. – Vol. 22. – P. 1409-1416.

Valero–Jiménez, C. A. Natural variation in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes. / C. A. Valero–Jiménez, A. J. Debets, J. A. Kan, S. E. Schoustra, W. Takken, B. J. Zwaan, C. J. Koenraadt // *Malaria journal*. – 2014. – Vol. 13. – P. 479–486.

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.

Maniania, A. Monzon, B. H. Ownley, J. K. Pell, D. E. N. Rangel, H. E. Roy // *Fungal Ecology*. – 2009. – Vol. 2. – P. 149–159.

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

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. Götz // *Journal of Insect Physiology*. – 1997. – Vol. 43. – №. 12. – P. 1149–1159.

Wasano, N. Spherical parasporal inclusions of the Lepidoptera-specific and Coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis* strains: a comparative electron microscopic study. / N. Wasano, C. Yasunaga-Aoki, R. Sato, M. Ohba, T. Kawarabata, H. Iwahana // *Current microbiology*. – 2000. – Vol. 40. – P. 128–131.

Watanabe, T. Molecular basis of the dopaminergic system in the cricket *Gryllus bimaculatus*. / T. Watanabe, H. Sadamoto, H. Aonuma // *Invertebrate neuroscience*. – 2013. – Vol. 13. – P. 107–123.

Wilson, K. Evolutionary ecology of insect host–parasite interactions: an ecological immunology perspective. / K. Wilson // *Symposium – Royal Entomological Society of London*. – 2005. – Vol. 22. – P. 289–342.

Wilson, M. H. Stress-induced changes of glucose levels in cockroach haemolymph. / M. H. Wilson, H. D. Rounds // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. – 1972. – Vol. 43. – P. 941–947.

Wojda, I. Humoral immune response upon mild heat-shock conditions in *Galleria mellonella* larvae. / I. Wojda, T. Jakubowicz // *Journal of insect physiology*. – 2007. – Vol. 53. – P. 1134–1144.

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. – Vol. 55. – P. 525–531.

Wojda, I. Heat shock affects host–pathogen interaction in *Galleria mellonella* infected with *Bacillus thuringiensis*. / I. Wojda, P. Taszłow // Journal of insect physiology. – 2013. – Vol. 59. – P. 894–905.

Woodring, J. P. The role of octopamine in handling and exercise-induced hyperglycaemia and hyperlipaemia in *Acheta domesticus*. / J. P. Woodring, L. A. McBride, P. Fields // Journal of insect physiology. – 1989. – Vol. 35. – №. 8. – P. 613–617.

Wraight, S. P. Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis tenebrionis*–based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. / S. P. Wraight, M. E. Ramos // Journal of Invertebrate Pathology. – 2005. – Vol. 90. – P. 139–150.

Wu, S. F. Dopamine modulates hemocyte phagocytosis via a D1-like receptor in the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. / S. F. Wu, G. Xu, D. Stanley, J. Huang, G. Y. Ye // Scientific reports. – 2015. – 5:12247 – doi: 10.1038/srep12247.

Yellman, C. Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*. / C. Yellman, H. Tao, B. He, J. Hirsh // Proceedings of the national academy of sciences. – 1997. – Vol. 94. – P. 4131–4136.

Yutin, N. The origins of phagocytosis and eukaryogenesis. / N. Yutin, M. Y. Wolf, Y. I. Wolf, E. V. Koonin. // Biology Direct. – 2009. – Vol. 4. – № 9. – P. 1–26.

Zdybicka–Barabas, A. Synergistic action of *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme against Gram–negative bacteria. / A. Zdybicka–Barabas, P. Mak, A. Klys, K. Skrzypiec, E. Mendyk, M. J. Fiołka, M. Cytryńska // Biochimica et Biophysica Acta. – 2012. – Vol. 1818. – P. 2623–2635.

Zhang, M. Y. Cloning and sequencing of a  $\beta$ -lactamase-encoding gene from the insect pathogen *Bacillus thuringiensis*. / M. Y. Zhang, A. Lövgren // *Gene*. – 1995. – Vol. 158. – P. 83–86.

Zhou, Z. A dopa decarboxylase modulating the immune response of scallop *Chlamys farreri*. / Z. Zhou, J. Yang, L. Wang, H. Zhang, Y. Gao, X. Shi, M. Wang, P. Kong, L. Qiu, L. Song // *PloS one*. – 2011. – Vol. 6. – №. 4. – e18596.

Zhukovskaya, M. Grooming behavior as a mechanism of insect disease defense. / M. Zhukovskaya, A. Yanagawa, B. T. Forschler // *Insects*. – 2013. – Vol. 4. – P. 609-630.