

На правах рукописи

ТЮРИН

Максим Викторович

Влияние эктопаразитоида *Habrobracon hebetor* Say на
развитие и распространение грибных инфекций у вошинной
огневки *Galleria mellonella* Linnaeus

03.02.05 – энтомология

АВТОРАФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена в лаборатории экологической паразитологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института систематики и экологии животных СО РАН

Научный руководитель:	Крюков Вадим Юрьевич доктор биологических наук
Официальные оппоненты:	Пономарев Василий Иванович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад УрО РАН, заведующий лабораторией лесовосстановления, защиты леса и лесопользования. Симакова Анастасия Викторовна, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», заведующий кафедрой зоологии беспозвоночных животных.
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно- исследовательский институт защиты растений», г. Санкт-Петербург, г. Пушкин.

Защита состоится 23 апреля 2019 года в 12 часов на заседании
диссертационного совета Д 003.033.01 при Институте систематики и
экологии животных СО РАН по адресу 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе
11.

Факс (383)217-09-73, e-mail: dis@eco.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
систематики и экологии животных СО РАН и на сайте
<http://www.eco.nsc.ru>.

Автореферат разослан « » 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Петрожицкая Людмила
Владимировна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Паразитоиды характеризуются особой формой взаимоотношений с организмами-хозяевами, являющейся переходной между хищничеством и паразитизмом. Личиночное развитие паразитоидов проходит внутри или на поверхности хозяина. После перехода паразитоида к свободному образу жизни, хозяин, в большинстве случаев, погибает. Особую стратегию имеют эктопаразитоиды, парализующие хозяев ядом, тем самым прекращая их дальнейшее развитие. Компоненты яда действуют на центральную нервную систему или нейромускулярные синапсы, вызывая, помимо парализации, изменения гуморального и клеточного иммунитета (Haspel et al., 2003; Rivers et al., 2005; Becchimanzi et al., 2017). Данная адаптация, помимо обездвиживания хозяина, направлена на прекращение его линек и подавление иммунитета, что обеспечивают успешное развитие потомства эктопаразитоида (Strand, Pech, 1995; Er et al, 2011; Richards, 2011). Однако, другой стороной данного типа взаимоотношений является «доступность» хозяина с подавленным иммунитетом для энтомопатогенных микроорганизмов. В целом перед паразитоидом стоит задача, с одной стороны избежать воздействия иммунной системы хозяина, с другой, необходимо, чтобы уровень ответа иммунной системы хозяина был достаточным для предотвращения инфекций, поскольку колонизация насекомого-хозяина микроорганизмами может привести к его непригодности для питания личинками паразитоида, либо даже к их инфицированию и гибели.

Предполагают, что ряд широко-специализированных энтомопатогенных грибов и бактерий используют в качестве основных ресурсов – насекомых с подавленным иммунитетом (Boomsma et al., 2014). При заражении энтомопатогенными грибами взаимодействия между паразитоидами и хозяевами часто нарушаются, и могут заканчиваться гибелью обоих звеньев системы (Roy, Pell, 2000). Данные работы проводились на моделях, включающих эндопаразитоидов, а работы на эктопаразитоидах единичны (Draganova, Balevski, 2000). Важно отметить, что среди эктопаразитоидов существуют виды, парализующие избыточное количество особей хозяев. То есть самки парализуют большее количество насекомых, чем они впоследствии будут использовать для откладки яиц. К таким видам, в частности, относится *Habrobracon hebetor* Say, развивающийся на различных чешуекрылых (Beard, 1952; Zikic et al., 2012; Ghimire & Phillips, 2014). Соответственно, парализованные насекомые с ослабленным иммунитетом могут быть весьма доступным ресурсом для энтомопаразитических микроорганизмов. В предыдущих исследованиях было обнаружено резкое (почти 5000-кратное) повышение восприимчивости личинок вощинной огневки *Galleria mellonella* Linnaeus

к широко-специализированным грибам *Beauveria bassiana* после их парализации паразитоидом *H. hebetor* (Kryukov et al., 2013). Исследователи связывали данный феномен с подавлением клеточного и гуморального иммунитета в гемолимфе вошинной огневки под воздействием яда (Kryukova et al., 2011). При этом оставалось неизвестным, каким образом парализация меняет чувствительность хозяев к грибам с разным уровнем специализации (условно-патогенным, узкоспециализированным или неспецифическим для хозяев группам грибов); как изменяется «поведение» грибов на/в парализованных насекомых; какие физиологические изменения хозяина вносят наибольший вклад в повышение чувствительности огневки к энтомопатогенам; как парализованные личинки реагируют на грибные инфекции; как изменяется симбионтная микробиота огневки при парализации ядом и как энтомопатогенные грибы взаимодействуют с этой микробиотой; возможна ли горизонтальная передача грибов от зараженных насекомых к здоровым посредством *H. hebetor*. Отметим, что в настоящий момент известна лишь одна работа (Oreste et al, 2016), где показана горизонтальная трансмиссия энтомопатогенных грибов с помощью эндопаразитоидов (*Encarsia formosa* Gahan).

Цель работы - изучить влияние парализации личинок *G. mellonella* паразитоидом *H. hebetor* на развитие грибных инфекций, исследовать горизонтальную трансмиссию энтомопатогенов эктопаразитоидом.

Задачи:

1. Проанализировать влияние парализации вошинной огневки паразитоидом *H. hebetor* на восприимчивость огневки к энтомопатогенным грибам с разным уровнем специализации;
2. Оценить эффективность горизонтального переноса энтомопатогенных грибов эктопаразитоидами *H. hebetor* в лабораторных популяциях вошинной огневки;
3. Исследовать реакции иммунитета вошинной огневки при их парализации *H. hebetor* и развитии грибных инфекций;
4. Оценить уровень накопления токсинов грибов у парализованных и не парализованных ядом личинок огневки;
5. Проанализировать изменения бактериального сообщества кишечника вошинной огневки при парализации паразитоидом и развитии микоза; оценить влияние микробиоты кишечника на развитие грибной инфекции;
6. Оценить возможность использования парализованных насекомых в качестве ловушек для выделения энтомопатогенных грибов из почв.

Положения, выносимые на защиту

1. Парализация личинок вошинной огневки паразитоидом *H. hebetor* приводит к резкому повышению восприимчивости личинок к энтомопатогенным аскомицетам с разным уровнем специализации, но не к условно-патогенным грибам.

2. Паразитоиды *H. hebetor* способны осуществлять горизонтальный перенос энтомопатогенных грибов среди личинок вошинной огневки. Успешный перенос обусловлен резким падением резистентности хозяев к грибам.

3. Повышение восприимчивости личинок хозяев к грибным патогенам под влиянием яда паразитоида *H. hebetor* обусловлено комплексом физиологических нарушений: изменением фунгистатических свойств кутикулы, падением уровня инкапсуляции, размножением симбиотических кишечных бактерий – синергистов грибов.

4. Использование личинок вошинной огневки, парализованных *H. hebetor* позволяет существенно повысить чувствительность метода приманок, для выделения энтомопатогенных грибов из почв.

Научная новизна

Впервые установлено повышение восприимчивости личинок чешуекрылых (на примере вошинной огневки), парализованных ядом *H. hebetor*, к энтомопатогенным аскомицетам с разным уровнем специализации. Впервые показан перенос грибов от зараженных насекомых к здоровым посредством паразитоида *H. hebetor*. Показано ослабление фунгистатических свойств кутикулы огневки под влиянием парализации. Впервые исследованы изменения параметров гуморального и клеточного иммунитета насекомых при совместном действии яда паразитоидов и энтомопатогенных грибов (*Beauveria bassiana*). В частности, установлено, что парализованные личинки характеризуются повышенным уровнем фенолоксидаз в кутикуле. Кроме того, парализованные насекомые способны отвечать на грибную инфекцию подъемом фенолоксидаз. Впервые установлены физиологические концентрации грибного токсина кордицепина в насекомых при развитии микозов (*Cordyceps militaris*) и показано, что накопление токсина замедляется у личинок, парализованных ядом паразитоида. Впервые показаны изменения в бактериальных сообществах кишечника насекомых под действием яда паразитоида и грибной инфекции. В частности, установлено, что парализация приводит к неконтролируемому размножению кишечных бактерий и существенному сдвигу в структуре сообщества в сторону преобладания грамотрицательных форм (*Enterobacteriaceae*). Показано, что изменения в структуре микробиома

вощинной огневки под действием парализации могут приводить к повышению восприимчивости к энтомопатогенным грибам (*B. bassiana*). Установлено, что метод выделения энтомопатогенных грибов из почв может быть значительно усовершенствован при использовании личинок огневки, парализованных ядом паразитоида.

Теоретическая и практическая значимость

Проведенное исследование взаимоотношений в системе насекомое-хозяин – эктопаразитоид – энтомопатогенный гриб открывает новые экологические аспекты трансмиссии патогенов, выявляет новые стороны физиологических взаимодействий в данной системе, а также позволяет выяснить ряд адаптаций энтомопаразитических грибов к насекомым-хозяевам. Анализ влияния симбионтной микробиоты исследуемых насекомых на развитие патогенезов открывает ряд новых перспектив в области эко-иммунологии, направленных на понимание межвидовых взаимоотношений в многокомпонентных системах. Развитие данного подхода в будущем позволит решить ряд прикладных задач. В частности, это даст возможность создать новые подходы к управлению численностью экономически значимых видов насекомых с использованием энтомопатогенных грибов, паразитоидов и симбиотических бактерий. Данные по секвенированию кишечных бактерий насекомых депонированы в GenBank и могут быть использованы для сравнительных микробиологических и молекулярно-генетических исследований. Кроме того, нами разработана оригинальная методика выделения грибов из почв с использованием личинок, парализованных ядом паразитоида. Данная методика позволяет выделять патогены при их низкой численности в почвенных образцах.

Степень достоверности результатов и апробации работы

Использованная для проведения экспериментов методическая база соответствует поставленным задачам. Для статистической обработки полученного материала применены параметрические и непараметрические методы анализа и современные программы (STATISTICA 8.0, SigmaStat 3.1, PAST 3).

Результаты исследований были представлены на 5 всероссийских и международных конференциях: V межрегиональная конференция «Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке», (Новосибирск 2015); всероссийская конференция с международным участием «Биоразнообразия и экология грибов и грибоподобных организмов северной Евразии» (Екатеринбург 2015); Международная научная конференция «Эколого-генетические основы современных агротехнологий» (Санкт-Петербург 2016); международная конференция

«Микробный и нематодный контроль беспозвоночных вредителей (IOBC-WPRS)» (Грузия, Тбилиси 2017); XV Съезд Русского энтомологического общества (Новосибирск, 2017).

Публикации

По материалам исследований опубликовано 9 работ в журналах перечня ВАК, из них 8 – в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus.

Личный вклад соискателя

Исследование патогенов насекомых, горизонтального переноса грибов паразитоидом, защитных систем насекомых, обработка и анализ данных проведены непосредственно автором. Метагеномный анализ сообществ бактерий кишечника вошинной огневки проводился в ЦКП Геномика Института химической биологии и молекулярной медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН). Видовая идентификация кишечных бактерий проведена совместно с лабораторией Молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН. Хроматографические исследования вторичных метаболитов грибов и экиктукулярных липидов насекомых проводились совместно с лабораториями Фитотоксикологии и биотехнологии Всероссийского института защиты растений (ВИЗР) и Лабораторией экологических исследований и хроматографического анализа Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН (НИОХ СО РАН).

Структура и объем диссертации

Рукопись состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложение. Общий объем диссертации 144 страницы, включая 3 таблицы и 20 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 261 работу, в том числе 232 на иностранных языках.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность за помощь и руководство научному руководителю д.б.н., В.Ю. Крюкову, а также всему коллективу лабораторий экологической паразитологии и патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН в особенности д.б.н. В.В. Глунову, к.б.н. О.Н. Ярославцевой, к.б.н., О.В. Поленовой, к.б.н. Н.А. Крюковой и к.с.-х.н. О.Г. Томиловой за регулярные обсуждения результатов и помощь в экспериментальной работе. За неоценимый вклад, связанный с хроматографическим анализом автор признателен д.б.н. О.А. Берестецкому (ВИЗР), к.х.н. С.В. Морозову и к.х.н. Е.И. Черняк (НИОХ

СО РАН). За важнейший вклад в работу, связанный с молекулярным анализом бактериальных сообществ насекомых я благодарен к.б.н. М.Р. Кабилову, Т.Ю. Аликиной, к.б.н. В.В. Морозовой (ИХБФМ СО РАН) и к.б.н. А.В. Кривопалову (ИСиЭЖ СО РАН). Также я выражаю глубокую благодарность к.б.н. И.А. Белоусовой и д.б.н. А.Г. Бутрову за полезные советы и замечания при подготовке рукописи. Исследования были проведены при финансовой поддержке грантов РФФИ № 15-04-02322а, № 16-54-53033Г_фен, № 17-34-50162мол_нр, № 18-04-00335а, № 18-34-20060мол_а_вед.

Глава 1. Обзор литературы

В главе приведены основные особенности биологии паразитоидов и энтомопатогенных грибов и основные защитные механизмы насекомых, направленные против этих групп организмов. Рассмотрены работы по влиянию кишечной микробиоты хозяина на развитие паразитоидов и грибов. Проанализированы исследования, посвященные взаимодействиям в трехкомпонентных системах насекомые-хозяева – паразитоиды – энтомопатогенные грибы. Показано, что данные работы проводились на системах, включающих эндо-, но не эктопаразитоидов.

Глава 2. Материалы методы

В работе использованы лабораторные популяции вошинной огневки *G. mellonella* и паразитоидов *H. hebetor*, а также культуры энтомопатогенных грибов из коллекций ИСиЭЖ СО РАН и ВИЗР. Личинок огневки содержали на искусственной питательной среде (Dubovskiy et al., 2013), а паразитоидов – на личинках пятого возраста вошинной огневки (Kryukova et al., 2011). Культуры грибов выращивали на стандартных питательных средах Сабуро и Чапека.

В экспериментах использовали личинок вошинной огневки парализованных и не парализованных ядом *H. hebetor*. Для парализации самок паразитоида подсаживали к личинкам огневки на 12 часов. Затем яйца паразитоида удаляли с кутикулы хозяина (Kryukov et al., 2013) и проводили заражение огневки грибами.

Для изучения патогенезов использовали конидии, бластоспоры и аскоспоры грибов. Для оценки восприимчивости к грибам с разной специализацией использовали конидии сапротрофных и условно патогенных аскомицетов *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp., конидии патогенов с широкой специализацией *Beauveria basiana*, *Metarhizium robertsii*, а также конидии либо аскоспоры энтомопатогенных грибов с ограниченной специализацией *Lecanicillium muscarium*, *Metarhizium pemphigum* и *Cordyceps militaris*. Парализованных и не парализованных личинок

заражали топикально и инкубировали в чашках Петри при 25°C, 100%-ной относительной влажности в течение 12 суток. У погибших личинок детектировали формирование склероциев (плотных сплетений гиф в гемоцеле), после чего раскладывали их во влажные камеры для прорастания грибов.

Для изучения показателей эффективности передачи грибной инфекции каждую личинку *G. mellonella* заражали путем погружения в суспензию конидий *B. bassiana* и помещали в индивидуальную чашку Петри (60 мм). Через 6 ч после обработки (этап адгезии) к каждой личинке подсаживали одну самку *H. hebetor*. После парализации эти самки были перемещены в чашки Петри с 10 интактными личинками *G. mellonella*. В эксперименте оценивали: 1) процент случаев успешной трансмиссии (если хотя бы одна из десяти личинок огневки в чашке Петри погибала от гриба, трансмиссию считали случившейся); 2) среднее количество личинок в чашках Петри, которые погибли от микоза в результате передачи конидий самкой паразитоида.

Для изучения изменения фунгистатических свойств кутикулы были получены экстракты кутикулы парализованных и не парализованных личинок *G. mellonella*. Использовали последовательную экстракцию эпикутикулы н-гексаном и дихлорметаном (Kryukov et al., 2017a). Данные экстракты были нанесены на агарозу и инокулированы конидиями *B. bassiana*. Через 24 часа оценивали уровень прорастания конидий путем световой микроскопии. Идентификация и количественный анализ жирных кислот и углеводов эпикутикулы проведен на основе газовой хроматомасс-спектрометрии в НИОХ СО РАН.

Параметры клеточного и гуморального иммунитета огневки оценивались при совместном действии парализации и перкутанного заражения грибом *B. bassiana*. Для измерения активности фенолоксидаз (ФО) в кутикуле пробоподготовка проводилась согласно методике И.М. Дубовского с соавт. (Dubovskiy et al., 2013) Активность ФО измеряли спектрофотометрически по образованию меланина при длине волны 490 нм. Концентрация белка измерялась по методу Бредфорда. Уровень инкапсуляции анализировали путем введения в гемолимфу насекомых нейлоновых имплантатов с последующей оценкой степени их потемнения с помощью программы Image J (Rantala, Roff, 2007).

Для изучения динамики накопления грибных токсинов парализованным и не парализованным личинкам огневки инъецировали в гемоцель blastospores гриба *C. militaris*. Пробоподготовка и экстракция токсинов гриба из гусениц проведена с использованием методик, описанных Rios-Moreno (2017) с небольшими модификациями (Тюрин и др., 2018). Анализ содержания токсинов проведен методом тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) совместно с

ВИЗР и НИИ Гигиены, профпатологии и экологии человека (г. Санкт-Петербург).

Влияние парализации и грибной инфекции (*B. bassiana*) на микробное сообщество кишечника воициной огневки проводили на основе высокопроизводительного секвенирования региона 16S рРНК на платформе Miseq Illumina (ЦКП Геномика). Культивируемую флору исследовали методом посева гомогенатов кишечника на селективные питательные среды для основных групп бактерий *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Serratia*. При этом оценивали количество колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий. Доминирующие виды бактерий тестировали на изменение восприимчивости насекомых к грибу *B. bassiana*. Для этого суспензии бактерий добавляли в корм зараженных и не зараженных грибом личинок огневки и оценивали динамику смертности (Polenogova et al., 2019).

Для оценки чувствительности метода приманок для выделения грибов из почв личинок огневки (парализованных и не парализованных паразитоидом) инкубировали в почве, содержащей различное количество конидий *B. bassiana* (Крюков и др., 2017). Затем оценивали смертность и проводили выделение грибов на искусственные питательные среды. Метод апробирован на почвах из разных биоценозов и природно-климатических зон России и Казахстана (Крюков и др., 2017).

Анализ данных проведен с использованием программ STATISTICA 8.0, SigmaStat 3.1, PAST и др. Для анализа выживаемости, в зависимости от схем экспериментов, использовали логит-регрессию, лог-ранк тест, критерий χ^2 и тест Спирмена-Карбера. Данные по физиологическим параметрам оценивались с помощью однофакторного или двухфакторного дисперсионных анализов для параметрических или непараметрических данных, что также зависело от дизайна экспериментов и нормальности распределения переменных. Данные на графиках приведены в виде средних арифметических и ошибок средних (SE).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Анализ восприимчивости парализованных личинок воициной огневки к грибам с разным уровнем специализации

Установлено, что парализация паразитоидом приводит к резкому повышению восприимчивости личинок огневки к грибам с широкой (*B. bassiana*, *M. robertsii*) и ограниченной специализацией (*C. militaris*, *L. muscarium*, *M. pempfigum*). В частности, у не парализованных личинок уровень смертности при топикальном заражении (1×10^5 конидий или аскоспор на личинку) не превышал 20%, тогда как у парализованных личинок данный уровень составлял 90–100% ($\chi^2 > 4.5$, $P < 0.05$).

Заражение парализованных и не парализованных личинок сапротрофными грибами (*S. brevicaulis*, *F. oxysporum*, *A. flavus* и *Penicillium sp.*) не приводило к развитию микозов. Сапротрофы были не способны проникать через кутикулу в гемоцель обеих групп личинок и образовывать склеротии. В некоторых случаях наблюдался только поверхностный рост. Таким образом, парализация огневки ядом *H. hebetor* способствует ослаблению резистентности личинок именно к энтомопатогенным грибам. Вероятно, иммунитет парализованных ядом личинок сохраняется на достаточном уровне для того чтобы противостоять сапротрофам.

3.2. Эффективность горизонтального переноса грибов паразитоидами *H. hebetor*

Установлена передача энтомопатогенного гриба самками паразитоида от гусениц огневки, зараженных *B. bassiana* (стадия адгезии), к здоровым личинкам (Рис. 1). Перенос, заканчивающийся успешным развитием микоза, регистрировался 78–92% случаев, что зависело от дозы для инокуляции личинок - источников инфекции ($\chi^2 = 12.8$; $P = 0.005$). После контакта с инфицированной личинкой одна самка паразитоида была способна к заражению в среднем от 2 до 5 здоровых личинок, что также зависело от доз ($r = 0.52$; $P = 0.005$).

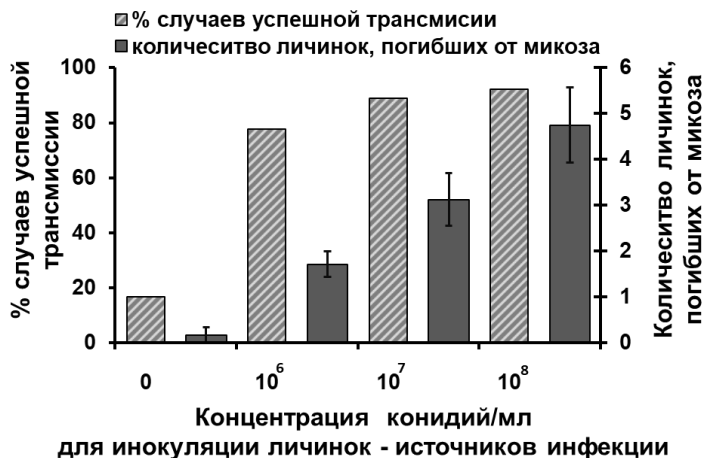


Рисунок 1. Эффективность переноса конидий *B. bassiana* от инфицированных к нативным личинкам *G. mellonella* самками паразитоида. Показан процент повторностей с успешным переносом гриба и среднее число личинок-реципиентов, погибших от микоза (7, 9, 9, 13 повторностей для концентраций 0, 10^6 , 10^7 и 10^8 соответственно; 1 повторность = 10 личинок).

В другом эксперименте самок паразитоида подсаживали к группам личинок огневки, в которых 40% особей были инфицированы *B. bassiana* (стадия адгезии), а 60% были не заражены. В присутствии паразитоидов наблюдалось существенное (13-кратное) повышение смертности от микозов, по сравнению с группами, где паразитоиды отсутствовали ($F_{1,54} = 155.8$, $P < 0.0001$) (Kryukov et al., 2018).

Установлено, что для успешной передачи конидий достаточно поверхностного контакта паразитоида и личинки огневки, то есть инъекция конидий яйцекладом в гемоцель хозяина не обязательна. В частности, показано, что самцы *H. hebetor* могут переносить конидии гриба столь же эффективно как и самки. Контакт самцов, инокулированных конидиями гриба, с парализованными личинками огневки приводит к сопоставимому уровню смертности от микозов, как и в случае контакта огневки с инокулированными самками (Kryukov et al., 2018).

Таким образом, успешное распространение грибной инфекции паразитоидом среди личинок огневки связано со способностью паразитоида передавать конидии от зараженных личинок к здоровым при поверхностном контакте, а также с резким снижением резистентности личинок огневки к грибам.

3.3. Защитные механизмы у личинок вощинной огневки, парализованных и не парализованных ядом *H. hebetor*

3.3.1. Влияние эпикутикюлярных экстрактов личинок огневки на прорастание грибов

Парализация личинок вощинной огневки паразитоидом приводила к изменению фунгистатических свойств кутикулы. Уровень прорастания конидий *B. bassiana* на экстракте эпикутикюлы, выполненном н-гексаном, был существенно выше для парализованных гусениц, по сравнению с не парализованными (Рис. 2). Прорастание конидий на экстракте, выполненном дихлорметаном, существенно не различалось. С помощью хроматографического анализа (ГХ-МС) выявлено, что парализация личинок огневки приводила к снижению содержания свободных жирных кислот и углеводов эпикутикюлы. В частности, достоверное ($P < 0.05$) снижение выявлено для миристиновой (C14:0) и линолевой (C18:2) кислот, а также углеводов н-пентакозана (C25) и н-гептакозана (C27).

3.3.2. Изменение уровня ФО и инкапсуляции у личинок *G. mellonella* при парализации, заражении грибом, а также их совместном действии

Парализация приводила к значительному повышению активности ФО в кутикуле личинок огневки (Рис. 3А). При этом парализованные личинки были способны реагировать на грибную инфекцию *B. bassiana*

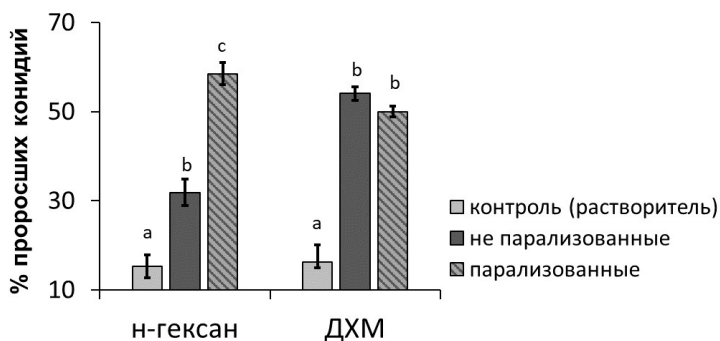


Рисунок 2. Проращание конидий гриба *B. bassiana* через 24 часа после инкубации на агарозе, обработанной экстрактами эпикутикулярных липидов личинок воштинной огневки. Экстракты получены путем последовательного смыва н-гексаном и, затем, дихлорметаном (ДХМ). Одинаковыми буквами указаны недостоверные различия внутри каждого типа экстракта (тест Тьюки, $P > 0.05$).

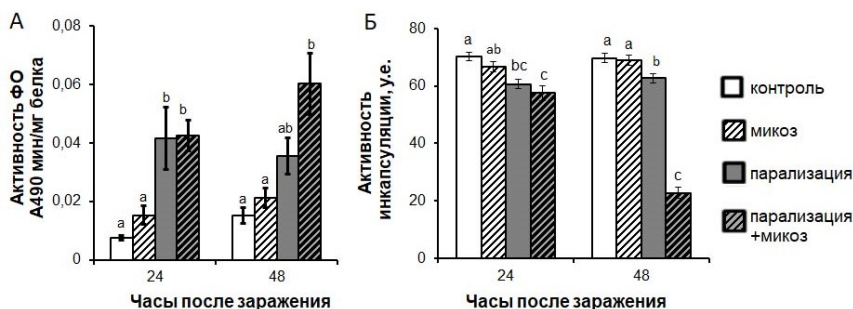


Рисунок 3. Активность фенолоксидаз в кутикуле (А) и интенсивность инкапсуляции нейлонового имплантата (Б) у личинок воштинной огневки при заражении энтомопатогенным грибом *B. bassiana* (1×10^6 конидий/мл) и парализации личинок ядом паразитоида. Одинаковыми буквами указаны недостоверные различия внутри одной временной точки (тест Тьюки, $P > 0.05$).

подъемом ФО на уровне отчетливой тенденции (тест Тьюки, $P = 0.07$, тест Фишера, $P = 0.05$). Как парализация, так и микоз приводили к существенному снижению уровня инкапсуляции, при этом наиболее резкое падение данного параметра регистрировалось при совместном действии факторов (Рис. 3Б).

Таким образом, снижение устойчивости к грибным патогенам у парализованных личинок, является результатом изменения

фунгистатических свойств кутикулы и подавления клеточного иммунитета. При этом парализованные личинки не являются «простым субстратом» для развития грибов, поскольку способны активно реагировать на грибную инфекцию подъемом ФО.

3.4. Динамика накопления гифальных тел и токсинов *C. militaris* в парализованных и не парализованных личинках вощинной огневки

При инъекциях бластоспор *C. militaris* в гемолимфу личинок огневки, в парализованных особях происходило более медленное накопление гифальных тел и токсинов гриба (кордицепин и кордицепиамида В), по сравнению с не парализованными личинками, что, по всей видимости, связано с изменениями в циркуляции гемолимфы под воздействием яда (Тюрин и др., 2018).

3.5. Изменения бактериальных сообществ кишечника вощинной огневки при парализации ядом *H. hebetor* и заражении грибом

Анализ бактериальных сообществ кишечника огневки на основе секвенирования региона 16S рРНК показал, что парализация приводит к резкой смене доминантов. В контрольных личинках преобладали грамположительные бактерии р. *Enterococcus*, а в парализованных – грамотрицательные бактерии сем. Enterobacteriaceae (эффект парализации: $H_{1,15} = 7.45$, $P = 0.006$; Рис. 4). Кроме того, при совместном действии парализации и грибной инфекции существенно увеличивалось обилие грамотрицательных бактерий *Serratia* (тест Данна: $P < 0.04$, по сравнению с другими вариантами). Посев гомогенатов среднего кишечника на селективные питательные среды показал, что парализация приводит к увеличению КОЕ энтерококков в 10-12 раз, а энтеробактерий – в 42-45 раз. Развитие микоза приводило к увеличению КОЕ бактерий р. *Serratia* у парализованных и не парализованных личинок ($H_{1,11} = 5.8$, $P = 0.016$).

Установлено что, скормливание личинкам огневки указанных бактерий приводило к увеличению восприимчивости к грибу *B. bassiana* на уровне синергистического эффекта (Рис. 5). Наиболее выраженный синергизм наблюдался при скормливании бактерий *Serratia* (Polenogova et al., 2019).

Таким образом, парализация приводит к неконтролируемому размножению бактерий в кишечнике огневки и сдвигу в структуре сообщества в сторону преобладания грамотрицательных энтеробактерий. Данные изменения приводят к усилению восприимчивости огневки к грибам.

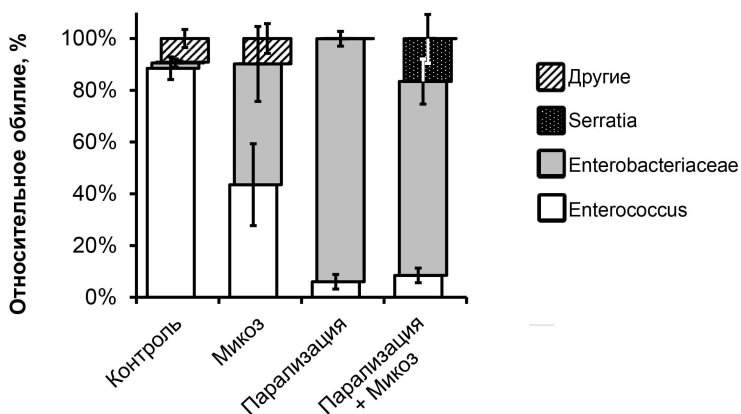


Рисунок 4. Метагеномный анализ сообществ кишечных бактерий личинок вошковой огневки через 72 часа после парализации *H. hebetor*, перкутанного заражения *B. bassiana* (1×10^6 конидий/мл) и действии обоих факторов.

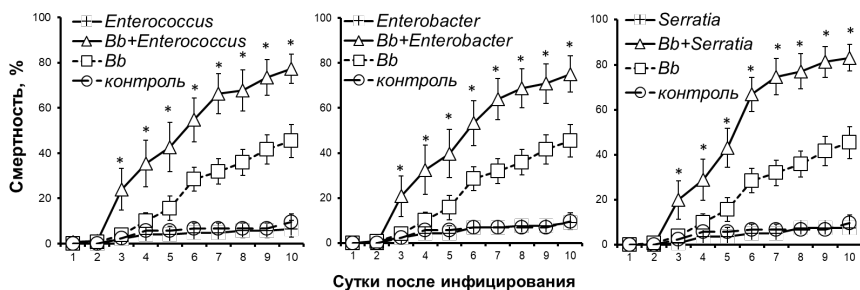


Рисунок 5. Динамика смертности личинок вошковой огневки после скармливания бактерий, выделенных из среднего кишечника (10^8 клеток/3 г корма) и заражения грибом *B. bassiana* (4×10^6 конидий/мл). * - синергизм между грибами и бактериями ($\chi^2 > 24.6$, $P < 0.001$).

3.6. Использование парализованных личинок в качестве ловушек для выделения грибов из почв

Сравнительный анализ полулетальных концентраций (LC_{50}) конидий грибов в почве показал, что использование парализованных личинок, увеличивает чувствительность метода ловушек в 193 раза (по сравнению с использованием нативных личинок). Метод апробирован на почвах из разных природно-климатических зон (от лесотундр до степей). Использование парализованных личинок (по сравнению с нативными) приводило к выделению существенно большего числа изолятов и видов

грибов (Тюрин и др., 2015; Крюков и др., 2017). Таким образом, использование данной модификации метода позволит выделять энтомопатогенные грибы из почв с низкими концентрациями конидий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Парализация хозяев ядом эктопаразитоида *H. hebetor* создает благоприятные условия для развития потомства паразитоида, однако, наблюдаемая при этом супрессия иммунитета хозяина способствует резкому снижению устойчивости к грибным инфекциям. При этом нами выявлено повышение восприимчивости гусениц воициной огневки к энтомопатогенным аскомицетам с различной специализацией – генералистам (*B. bassiana*, *M. robertsii*), грибам с ограниченной специализацией (*C. militaris*), в том числе неспецифическим для чешуекрылых видам (*M. pemphigum*, *L. muscarium*). В то же время для условных патогенов (*Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Penicillium*, *Fusarium*) подобный эффект не регистрировался. По всей видимости, ослабление защитных реакций хозяина до определенного уровня под действием парализации приводит к резкому снижению резистентности к энтомопатогенам, но является достаточным, чтобы избежать инфицирования сапротрофами. На основе данной модели нам удалось усовершенствовать метод приманок для выделения энтомопатогенных грибов из почв с использованием парализованных личинок огневки. Полученные данные показывают, что состояние стресса, сопряженное с подавлением реакций иммунитета, необходимо для успешного развития не только широко-специализированных энтомопатогенов (Boomsma et al., 2014), но и грибов с ограниченным кругом хозяев.

В лабораторных экспериментах нами установлена высокая эффективность горизонтальной трансмиссии энтомопатогенных грибов от зараженных личинок огневки, к здоровым, посредством самок эктопаразитоида. При этом, введение конидий яйцекладом в гемоцель не является обязательным условием для успешного распространения микоза.

Возможность успешной трансмиссии в исследуемой модели определяется многократным падением устойчивости воициной огневки к грибным инфекциям после парализации ядом, что в первую очередь связано с кутикулярными изменениями. В частности, нами установлено значительное увеличение прорастания конидий на эпикутикулярных экстрактах парализованных личинок. В данных экстрактах регистрировалось снижение содержания свободных жирных кислот и углеводов по сравнению с нативными (не парализованными) личинками. Поскольку жирные кислоты способны ингибировать прорастание конидий (Ment et al., 2013), а углеводороды играют важную роль в питании грибов и формировании их вирулентности (Pedrini, 2018),

мы предполагаем, что изменение восприимчивости на ранних этапах заражения связано с изменением биохимических и фунгистатических свойств эпикутикулы. Следует отметить, что в кутикуле у парализованных гусениц отмечен более высокий уровень фенолоксидаз, по сравнению с нативными личинками. При этом парализованные личинки реагировали на грибное вторжение подъемом уровня фенолоксидаз, но это не предотвращало быстрого развития грибной инфекции. Кроме того, яд паразитоида подавлял уровень инкапсуляции, что согласуется с ранее проведенными исследованиями (Kryukova et al., 2011; Vecchminazi et al., 2017). Активность инкапсуляции играет существенную роль в устойчивости к грибам, поэтому снижение данного параметра, по всей видимости, является одной из важнейших причин повышения восприимчивости к патогенам. Интересно, что несмотря на падение клеточного иммунитета, накопление гифальных тел и токсинов грибов в парализованных гусеницах происходило медленнее, чем в не парализованных, что может быть объяснено замедлением циркуляции гемолимфы после введения яда.

Изменения, происходящие в кутикуле и гемоцеле личинок огневки при парализации, могут быть связаны не только с прямым действием яда, но и с изменениями в кишечной микробиоте, наблюдаемыми в результате нарушения перистальтики кишечника. Нами было установлено, что парализация приводит к всплеску численности доминантных бактерий и значительному сдвигу в структуре сообщества от грамположительных бактерий (*Enterococcus*) к грамотрицательным (*Enterobacteriaceae*). Интересно, что грибная инфекция приводила к значительному повышению численности условного патогена *S. marcescens* в кишечниках парализованных личинок. Возможно, патоген, проникающий через кутикулу, может «манипулировать» кишечной микробиотой хозяина, тем самым, обеспечивая себе успешное развитие, как показано в недавнем исследовании на комарах *Anopheles* (Wei et al., 2017). Нами установлено, что скормливание личинкам огневки кишечных бактерий, увеличивающих свою численность при парализации (*Enterococcus*, *Enterobacter*, *Serratia*), приводило к усилению восприимчивости к грибам *B. bassiana*. Физиологические механизмы данных синергистических взаимодействий остаются не выясненными и требуют дальнейших исследований.

С эколого-эволюционной точки зрения возникает вопрос, почему *H. hebetor* не сформировал надежных механизмов защиты своих хозяев от энтомопатогенных грибов? Многие эндопаразитоиды демонстрируют различные способы защиты от патогенов, такие как избегание зараженных хозяев (Rännbäck et al., 2015; Cotes et al., 2015) или выделение антимикробных компонентов в гемолимфу хозяина для

предотвращения грибных и бактериальных инфекций (Richards, 2012; Weiss et al., 2014). Мы также наблюдали определенный фунгистатический эффект на кутикуле вошинной огневки в местах питания личинок *H. hebetor*, однако, при завершении питания паразитоида личинки огневки полностью колонизировались грибами (Крюков и др., 2018). То есть действие фунгистатических компонентов, выделяемых личинками паразитоида, было лишь локальным и временным. Мы предполагаем, что идиобионтные паразитоиды с короткой продолжительностью личиночной стадии (3–4 суток) не нуждаются в высокоразвитых механизмах защиты от грибов и бактерий, по сравнению койнобионтными эндопаразитоидами, длительно живущими в хозяевах. Кроме того, поскольку самки *H. hebetor* парализуют избыточное количество особей, а личинки паразитоида не употребляет хозяина в пищу полностью, образуется богатый ресурс для размножения различных микроорганизмов. Энтомопатогенные грибы могут быть одними из кандидатов для освоения этой «неиспользованной пищи».

В заключение главы отметим наиболее важные, с нашей точки зрения, перспективы исследований системы *G. mellonella* – *H. hebetor* – энтомопатогенные грибы. Во-первых, – это исследование уровня экспрессии генов, связанных с синтезом гидролитических ферментов и регуляцией конидиеобразования у грибов при их развитии на парализованных и не парализованных личинках. Кроме того, в кутикуле этих групп личинок необходим анализ экспрессии генов, связанных с защитой от грибных инфекций (ингибиторы протеиназ, антимикробные пептиды). Данное исследование может прояснить изменение поведения энтомопатогенных грибов на парализованных личинках и выявить новые механизмы восприимчивости насекомых к грибам. Во-вторых, весьма перспективным представляется исследование механизмов изменения восприимчивости огневки к грибам, при изменении структуры кишечной микробиоты. Эта работа даст новые представления о роли кишечных бактерий в грибных патогенезах, а также о различиях в чувствительности к патогенам между группами насекомых, различающихся по происхождению, питанию, иммунному статусу и др. В третьих, – это исследование сообществ микроорганизмов самих паразитоидов, взаимодействий эндосимбионтов *H. hebetor* с энтомопаразитическими грибами, что может прояснить механизмы защиты паразитоидов от грибных патогенов и установить новые механизмы подавления иммунитета хозяина паразитоидом.

ВЫВОДЫ

1. Парализация вошинной огневки ядом *H. hebetor* способствует повышению восприимчивости к энтомопатогенным, но не к сапротрофным грибам. Ослабление резистентности наблюдается как к широко-специализированным патогенам (*B. bassiana*, *M. robertsii*), так и к патогенам с ограниченным кругом хозяев (*C. militaris*, *M. pemphigum*, *L. muscarium*).

2. Самки паразитоида *H. hebetor* способны переносить конидии энтомопатогенного гриба *B. bassiana* от зараженных личинок вошинной огневки к здоровым, что приводит к успешному развитию микозов. Для успешной трансмиссии достаточен поверхностный контакт зараженного паразитоида и хозяина, не требуется введения конидий в гемоцель яйцекладом паразитоида.

3. Под действием парализации ядом *H. hebetor* у вошинной огневки изменяется биохимический состав кутикулы, выражающийся в изменении содержания углеводов и жирных кислот, при этом наблюдается 2-кратное повышение прорастания конидий грибов (*B. bassiana*) на эпикутикулярном экстракте.

4. Личинки вошинной огневки, парализованные ядом *H. hebetor*, реагируют на грибную инфекцию (*B. bassiana*) 1.5-кратным подъемом фенолоксидазной активности в кутикуле и резким (трехкратным) падением уровня инкапсуляции в гемолимфе.

5. У личинок огневки, парализованных ядом *H. hebetor*, наблюдается более медленное, накопление грибных токсинов (кордицепина и кордицепиамида В) по сравнению с не парализованными личинками при развитии микозов *C. militaris*.

6. Под влиянием яда паразитоида у огневки происходит неконтролируемое размножение кишечных бактерий и резкий сдвиг в структуре микробного сообщества от грамположительных бактерий (*Enterococcus*) к грамотрицательным (*Enterobacter* и *Serratia*). Размножение данных бактерий приводит к усилению восприимчивости огневки к энтомопатогенным грибам *B. bassiana* на уровне синергистического эффекта.

7. Использование личинок *G. mellonella*, парализованных ядом *H. hebetor*, повышает чувствительность метода приманок для выделения энтомопатогенных грибов из почв почти в 200 раз. Предложенный метод позволяет выделять грибы из почв с низкой численностью конидий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИСЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК:

Крюков, В.Ю. Реакции иммунитета большой вошинной огневки *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) при комбинированном действии энтомопатогенов *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Link и *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Ascomycota, Hypocreales) / Крюков В.Ю., Ярославцева О.Н., Сурина Е.В., Тюрин М.В., Дубовский И.М., Глупов В.В. // Энтомологическое обозрение. – 2015. – Т. 94. – № 3. – С. 499-506.

Тюрин, М.В. Сравнительный анализ иммунного ответа личинок колорадского жука при развитии микозов, вызванных *Metarhizium robertsii*, *M. brunneum* и *M. pempighi* / М.В. Тюрин, В.Ю. Крюков, О.Н. Ярославцева, Е.А. Елисафенко, И.М. Дубовский, В.В. Глупов // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2016. – Т. 25. – № 3. – С. 226-232.

Крюков, В.Ю. Иммуносупрессия насекомых ядом паразитоида *Habrobracon hebetor* увеличивает чувствительность метода выделения энтомопатогенных грибов из почв / В.Ю. Крюков, М.В. Тюрин, О.Г. Томилова, О.Н. Ярославцева, Н.А. Крюкова, Б.А. Дуйсембеков, Ю.С. Токарев, В.В. Глупов // Известия РАН. Серия биологическая – 2017. – № 3. – С. 401-405.

Kryukov, V. Ecological preferences of *Metarhizium* spp. from Russia and neighboring territories and their activity against Colorado potato beetle larvae / V. Kryukov, O. Yaroslavl'tseva, M. Tyurin, Y. Akhaneaev, E. Elisaphenko, T.-C. Wen, O. Tomilova, Y. Tokarev, V. Glupov // Journal of Invertebrate Pathology – 2017. – V. 149. – P. 1-7.

Kryukov, V.Yu. Fungal infection dynamics in response to temperature in the lepidopteran insect *Galleria mellonella* / V.Yu. Kryukov, O.N. Yaroslavl'tseva, M.M.A. Whitten, M.V. Tyurin, K.J. Ficken, C. Greig, N.R. Melo, V.V. Glupov, I.M. Dubovskiy, T.M. Butt // Insect Science. – 2018. – V. 25. – P. 454-466.

Kryukov, V.Yu. Passive vectoring of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* among the wax moth *Galleria mellonella* larvae by the ectoparasitoid *Habrobracon hebetor* females / V.Yu. Kryukov, N.A. Kryukova, M.V. Tyurin, O.N. Yaroslavl'tseva, V.V. Glupov // Insect Science. – 2018. – V 25– № 4 – P. 643-654.

Тюрин, В.М. Накопление метаболитов энтомопатогенного гриба *Cordyceps militaris* в личинках вошинной огневки *Galleria mellonella* L. / В.М. Тюрин, Т.И. Орлова, О.Г. Томилова, Е.И. Савельева, В.Ю. Крюков,

А.О. Берестецкий // Евразийский энтомологический журнал – 2018. – Т. 17. – № 5: – С. 373–377.

Vorontsova, Y.L. The effect of entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* of different virulence on the generation of reactive oxygen species in *Galleria mellonella* larvae / Y.L. Vorontsova, I.A. Slepneva, A.A. Alekseev, V.Y. Kryukov, M.V. Tyurin, V.V. Glupov // Invertebrate Survival Journal – 2018. – № 15 – P. 276-284.

Polenogova, O.V. Parasitoid envenomation alters the *Galleria mellonella* midgut microbiota and immunity, thereby promoting fungal infection / O.V. Polenogova, M.R. Kabilov, M.V. Tyurin, U.N. Rotskaya, A.V. Krivopalov, V.V. Morozova, K. Mozhaitseva, N.A. Kryukova, T. Alikina, V.Yu. Kryukov, V.V. Glupov // Scientific Reports – 2019. (accepted) doi. 10.1038/s41598-019-40301-6.

Материалы и тезисы конференций

Тюрин, М.В. Усовершенствование метода выделения энтомопатогенных грибов из почвы / М.В. Тюрин, В.Ю. Крюков, О.Н. Ярославцева, В.В. Глупов, // Биоразнообразие и экология грибов и грибоподобных организмов северной Евразии: Материалы Всерос. конф. с международ. участием. Екатеринбург, 20-24 апреля – 2015. – С. 263-264.

Тюрин, М.В. Горизонтальный перенос энтомопатогенных грибов эктопаразитом *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) среди чешуекрылых. / М.В. Тюрин, В.Ю. Крюков, Н.А. Крюкова, С.В. Морозов, О.Н. Ярославцева, Е.И. Черняк, В.В. Глупов // XV съезд Русского энтомологического общества. Новосибирск, 31 июля – 7 августа – 2017. – С. 487-488.