

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

На правах рукописи

УДК 592

Тюрин Максим Викторович

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

03.02.05 – энтомология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

**Научный руководитель –
доктор биологических наук**

В.Ю. Крюков

Новосибирск – 2019

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	13
1.1. Паразитоиды и энтомопатогенные грибы, их основные экологические группы и воздействие на насекомых-хозяев	13
1.1.1. Паразитоиды	13
1.1.2. Эктопаразитоид <i>H. hebetor</i> : распространение, трофические связи, жизненный цикл, действие яда	16
1.1.3. Энтомопатогенные аскомицеты (<i>Ascomycota</i> , <i>Нуроскреales</i>)	19
1.2. Защитные системы насекомых	26
1.2.1. Внешние защитные системы	26
1.2.2. Внутренние защитные системы	29
1.2.2.1. Клеточный иммунитет	30
1.2.2.2. Гуморальный иммунитет	32
1.2.3. Роль микробиоты кишечника в защите от патогенов и паразитоидов	33
1.3. Взаимодействия в трехкомпонентных системах насекомые-хозяева – паразитоиды – энтомопатогенны	36
1.4. Заключение	41
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1. Объекты исследования	43
2.2. Общий экспериментальный дизайн	44
2.3. Анализ восприимчивости парализованных насекомых к энтомопатогенным грибам с разным уровнем специализации и к сапротрофам	45
2.4. Изучение эффективности горизонтальной передачи энтомопатогенного гриба паразитоидом	46
2.5. Изменения защитных систем огневки при парализации ядом и заражении грибами	49

2.5.1. Биохимические свойства эпикутикулы и влияние эпикутикулярных экстрактов на рост грибов	49
2.5.2. Активность фенолоксидаз (ФО)	51
2.5.3. Уровень инкапсуляции	52
2.6. Динамика накопления грибных токсинов у парализованных и не парализованных личинок вощинной огневки	53
2.7. Анализ микробных сообществ личинок <i>G. mellonella</i> при парализации <i>H. hebetor</i> и заражении грибами	55
2.8. Модернизация метода ловушек на основе использования парализованных личинок вощинной огневки	57
2.8.1. Оценка чувствительности метода	57
2.8.2. Выделение и идентификация грибов из почвенных образцов	58
2.9. Статистическая обработка	59
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	61
3.1. Анализ восприимчивости парализованных личинок вощинной огневки к грибам с разным уровнем специализации	61
3.2. Эффективность горизонтального переноса грибов паразитоидами <i>H. hebetor</i>	65
3.3. Защитные механизмы у личинок вощинной огневки, парализованных и не парализованных ядом <i>H. hebetor</i>	72
3.3.1. Влияние эпикутикулярных экстрактов личинок огневки на прорастание грибов	72
3.3.2. Изменение уровня фенолоксидазы и инкапсуляции у личинок <i>G. mellonella</i> при парализации, заражении грибом, а также их совместном действии	76
3.4. Динамика накопления гифальных тел и токсинов <i>S. militaris</i> в парализованных и не парализованных личинках	82

вощинной огневки	
3.5. Изменения бактериальных сообществ кишечника вощинной огневки при парализации ядом <i>H. hebetor</i> и заражении грибом	88
3.6. Использование парализованных личинок в качестве ловушек для выделения грибов из почв	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
ВЫВОДЫ	108
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	110
ПРИЛОЖЕНИЕ	140

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; Vecchimanzi 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 эндопаразитов, а работы на эктопаразитоидах единичны (Draganova, Balevski, 2000). Важно отметить, что среди эктопаразитов 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 вошинной 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 вощинной огневки. Успешный перенос обусловлен резким падением резистентности хозяев к грибам.

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

4. Использование личинок вощинной 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 вощинной 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 вошинной 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 патогенов 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 «Биоразнообразие 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 патогенезов 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 эпикутикулярных 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 работ, 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. Глупову, к.б.н. О.Н. Ярославцевой, к.б.н., О.В. Поленоговой, 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 Бугрову 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_a_вед.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Паразитоиды и энтомопатогенные грибы, их основные экологические группы и воздействие на насекомых-хозяев

1.1.1. Паразитоиды

Термин паразитоид впервые введен в 1913 году Рейтером, а позже адаптирован У. М. Уилером (Викторов, 1959). В настоящее время паразитоидами называют организмы, развитие личиночной стадии которых проходит на, или внутри единственного хозяина, которым они питаются, и впоследствии, убивают. Согласно данному определению к паразитоидам могут относиться как определенные группы насекомых, так и большинство энтомо-паразитических грибов (Ройтман, Беэр, 2008). Для насекомых также был предложен более узкий термин «*карнивороиды*». "Карнивороиды — это насекомые-энтомофаги, онтогенетическое развитие которых зависит целиком или почти целиком от питательных веществ, полученных от поедания содержимого тела единственного индивида хозяина или яиц такого индивида, или группы личинок такого индивида" (Малышев, 1966; Flanders, 1973). В настоящей работе мы будем использовать общепринятый в мировой литературе термин паразитоид применительно только к насекомым. Паразитоиды известны среди представителей отрядов Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Trichoptera, Neuroptera и Strepsiptera. В тоже время, большая часть паразитоидов (90%) принадлежат к трем семействам перепончатокрылых – *Ichneumonidae*, *Braconidae* и *Pteromalidae* (Eggleton, Gaston, 1990; Godfray, 1994; Тобиас, 2004). а при

Паразитической фазой развития паразитоидов являются личинки, которые, как правило, питаются одной личинкой хозяина на протяжении всей жизни. Имаго ведут свободный образ жизни и преимущественно питаются нектаром. Поскольку гибель хозяина при питании на нем паразитоида является ключевой особенностью, то паразитоидов рассматривают как организмов, занимающих промежуточное положение между хищниками и

паразитами (Ройтман, Бэер, 2008). Известно, что в некоторых случаях паразитирование может не приводить к смерти хозяина и насекомые могут «выздоровливать» благодаря инактивации яиц или личинок паразитоидов за счет иммунного ответа (Hudon, 1959; Maure et al., 2011, 2014; Dheilly et al 2015; Luna et al., 2016). В большинстве случаев паразитоиды приурочены к развитию на конкретной стадии насекомого хозяина (яйца, личинки, куколки или имаго).

По месту паразитирования на/в хозяине выделяют эктопаразитоидов и эндопаразитоидов. Экто- и эндопаразитоиды имеют ряд существенных экологических отличий. Так эктопаразитоиды заражают преимущественно скрытоживущих хозяев, предпочитают личинок старших возрастов, необратимо парализуют хозяина, тем самым, останавливая его развитие, имеют крупные яйца с большим запасом желтка, плотным хорионом и характеризуются быстрым развитием личинок (Тобиас, 2004; Pennacchio, Strand, 2006). Эндопаразитоиды способны заражать, как скрытоживущих, так и открытоживущих хозяев в равной степени. Они заражают личинок всех возрастов, куколок, имаго и имеют более мелкие яйца. У эндопаразитоидов выражена приуроченность к определенному таксону хозяев (Черногуз, 1993).

Нередко на одном хозяине паразитируют несколько личинок паразитоида одного вида. По этому критерию паразитоидов делят на групповых (грегарных) и одиночных (солитарных). Групповой паразитизм встречается как у эктопаразитоидов так и у эндопаразитоидов. Групповой паразитизм может развиваться несколькими путями, например, при полиэмбрионии или откладке самкой нескольких яиц на одного хозяина. Многие эктопаразитоиды, имеющие широкий круг хозяев, являются групповыми, например, многие хальциды (Chalcidoidea), а также некоторые ихневмониды (Каспарян, 1996; Тобиас, 2004). В ряде работ показано возникновение полиэмбрионии у перепончатокрылых и вторичный переход к групповому типу паразитирования. Примером могут служить бракониды

рода *Macrocentrus* и хальциды, паразитирующие на щитовках (Сугоняев, 1962). Групповое паразитирование позволяет поддерживать более высокую плотность популяции паразитоида при низкой численности хозяев. Среди паразитоидов встречаются отдельные виды, способные как к групповому, так и к одиночному паразитизму. Так *Adelognathus cubiceps* Roman (Ichneumonidae) в 1-м поколении ведет себя как одиночный, а во 2-м – как групповой паразит (Kopelke, 1987).

Также паразитоидов разделяют на койнобионтов (хозяева продолжают развиваться до момента выхода паразитоида) и идиобионтов (хозяева прекращают развитие). Идиобионты представлены в основном эктопаразитоидами, которые парализуют хозяина, или эндопаразитоидами, атакующими неактивную форму хозяина (яйца, куколки). Среди койнобионтов чаще встречаются эндопаразитоиды, которые развиваются на растущем хозяине (Pennacchio, Strand, 2006; Крюкова, Глупов, 2014). Стоит также упомянуть эктопаразитоидов, развивающихся на имагинальной стадии хозяев. Их, как правило, относят к койнобионтам, так как они зависят от физиологического состояния хозяина. В ряде работ высказывается предположение, что эволюция паразитических насекомых идет от хищничества через эктопаразитизм к истинному паразитизму (Черногуз, 1993; Pennacchio, Strand, 2006). Биологический прогресс свойственен как идиобионтам, так и койнобионтам, при этом для койнобионтов свойственна более глубокая и быстрая морфологическая дифференциация и, как следствие, высокая скорость формирования таксонов высокого ранга (Каспараян, 1996).

Хорошо известно, что паразитоиды играют важнейшую роль в динамике численности насекомых хозяев (Leslie and Park 1949; Тряпицын, 1982; Grieshop et al., 2006). Например, показано значительное влияние ихневмонид (Ichneumonidae) и тахин (Tachinidae) на динамику численности чешуекрылых летне-осеннего комплекса - филлофагов лиственных деревьев

в Сибири (Гниненко и др., 1985). Для регуляции численности экономически значимых видов используют паразитоидов р. *Encarsia*, *Fopius alternatae* Wharton, *H. hebetor*, *Trichogramma evanescens* Westwood, *Trichogramma pintoi* Voegelé и ряд других. При этом, выращенных в лабораторных условиях паразитоидов выпускают в теплицы или на сельскохозяйственные посевы (Cline, Press, 1990; Brower, Press, 1990; Белоусов и др., 2015; Асякин. 2003).

1.1.2. Эктопаразитоид *H. hebetor*: распространение, трофические связи, жизненный цикл, действие яда

H. hebetor принадлежит к семейству Braconidae, которое включает в себя только эктопаразитоидов. Виды рода *Habrobracon* демонстрируют разную степень специализации к насекомым хозяевам, начиная от узкой специализации к одному виду хозяина, до широкой – к сотням видов хозяев из разных семейств (Shaw & Huddleston, 1991). *H. hebetor* поражает широкий круг чешуекрылых из семейств *Pyralidae*, *Gelechiidae*, *Crambidae*, *Noctuidae*, *Tortricidae*, *Tineidae* (Ghimire & Phillips, 2010, 2014; Zikic et al., 2012; Borzoui et al., 2016). Паразитоид активно используется как агент контроля численности различных чешуекрылых, в частности вредителей запасов, таких как американская амбарная огневка *Plodia interpunctella* Hübner, мельничная огневка *Ephestia kuehniella* Zeller, рисовая огневка *Chilo suppressalis* Walker и др. (Grieshop et al., 2006; Eliopoulos and Stathas, 2008; Adarkwah et al., 2010), а также хлопковой совки *Helicoverpa armigera* Hubn. (Eliopoulos & Stathas, 2008; Ghimire & Phillips, 2010; Borzoui et al., 2016).

Эктопаразитоид *H. hebetor* относится к группе гregarных идиобионтов. Самки паразитоида парализуют хозяев ядом, после чего хозяин прекращает свое развитие. Самки паразитоида предпочитают атаковать личинок старших возрастов, но нередко атакуют и младшие возраста (Benson, 1973b). Теоретически одна самка способна поразить от 500 до 1000 личинок хозяина (Beard, 1952). Количество парализуемых особей зависит от

плотности и вида хозяина (Taylor, 1988). В лабораторных условиях одна самка *H. hebetor* обычно парализует до 20 гусениц, после чего откладывает яйца на личинок хозяина. Самки откладывают яйца в течение всей жизни. На одну гусеницу самка может отложить до 20 яиц. Известно, что некоторые самки *H. hebetor* проявляют овицидное поведение, прокалывая яйцекладом яйца отложенные другими самками, а также активно питаются гемолимфой хозяина в местах прокола яйцекладом (Benson, 1973a; Strand and Godfray, 1989; Antolin et al., 1995; Baker, Fabrick, 2000). Личинки *H. hebetor* развиваются от 3 до 11 дней в зависимости от температуры. Так при выращивании паразитоида на личинках *G. mellonella* наименьшее время развития наблюдалось при 35°C, а наибольшее – при 18°C, в тоже время при 16°C личинки погибали (Beard, 1952; Forouzan et al, 2008). Взрослые паразитоиды при 25°C без дополнительного питания живут 6-10 дней (самки) и 4-10 дней (самцы) (Benson, 1973a). При ежедневном контакте с хозяином или углеводном питании продолжительность жизни имаго может увеличиваться в среднем до 25–30 дней (Clark and Smith, 1967). Вид хозяина не оказывает значительного влияния на скорость развития личинок паразитоида, но существенно влияет на плодовитость самок паразитоида (Magro and Parra, 2001; Forouzan et al., 2008). Известно, что самки *H. hebetor* предпочитают атаковать тот вид, на котором развивались личинки предыдущих поколений (Magro and Parra, 2001).

Яд *H. hebetor* вызывает полный паралич хозяина в течение 15 мин (Hagstrum and Smittle, 1978), что связано с блокировкой нервно-мышечной передачи на пресинаптических участках. У личинок хозяев наблюдается полная остановка локомоции, пропадает реакция на внешние раздражители, при этом сохраняется сердечный ритм и функции средней кишки. Для парализации одной личинки *G. mellonella* достаточно 5 нг яда (Beard, 1952; Piek and Mante, 1970). Исследователям удалось выделить ряд компонентов яда самок *H. hebetor*. В работах М. Тамасиро (Tamashiro, 1971) было

показано, что основным компонентом яда является белкоподобное вещество. Затем, в работах Б. Дж. Виссера с соавторами (Visser et al., 1976) описан токсин яда, представляющий белок с парализующей активностью (молекулярные массы 61 кДа). Позже обнаружены еще два токсина (молекулярные массы 44 и 57 кДа), обладающие парализующей активностью. Десятилетие спустя изучено действие токсина массой 18 кДа. и показано его избирательное влияние на глутаматергические нервно-мышечные синапсы насекомых (Славнова и др. 1987). В 1994 году Г. Б. Квистад описал токсин (массой 73 кДа.), обладающий инсектицидной активностью. Однако все выделенные токсины обладали более низкой инсектицидной активностью по сравнению с неочищенным ядом (Visser et al, 1983; Quistad, 1994).

Влияние яда паразитоидов на иммунные реакции насекомых исследовано недостаточно. Действие яда *H. hebetor* на основные защитные системы насекомых рассмотрены в работах Н.А. Крюковой с соавторами (Kryukova et al., 2011, 2015). В данных работах показано, что инъекция яда личинкам вощинной огневки приводит к активации кальций-зависимых апоптозо-подобных процессов разрушения клеток иммунокомпетентного звена, и в первую очередь плазматоцитов и гранулоцитов. Снижается способность гемоцитов к адгезии за счёт нарушения цитоскелета, происходит подавление активности фенолоксидаз в гемолимфе (более чем в 2 раза) и снижение уровня инкапсуляции (более чем в 1.5 раза). Автор объясняет это тем, что классическим проявлением паразитизма является частичное подавление иммунной системы хозяина при сохранении определенной активности некоторых ее звеньев, способных предотвратить заражение микроорганизмами. Последнее обстоятельство наиболее важно для предотвращения гибели хозяина в первую очередь от вульгарной микрофлоры. Двукратное падение уровня инкапсуляции и меланизации у личинок *Spodoptera littoralis* Boisduval под действием яда близкого вида

Habrobracon nigricans Szépligeti установлено в недавней работе А. Бекчиманзи с соавт. (Vecchimanzi et al., 2017).

Важно отметить, что самки *H. hebetor* всегда парализуют избыточное количество личинок, то есть большее, чем в последствии будет использовано для откладки яиц (Richards & Thomson, 1932; Kryukov et al., 2013). Кроме того, личинки паразитоида, как правило, не полностью употребляют хозяина в пищу, что может приводить к образованию определенного ресурса для развития патогенных или гетеротрофных микроорганизмов. Следует отметить, что парализация личинок не приводит к быстрой гибели от вторичных инфекций (Baker, Fabrick, 2000; Johnson et al., 2000), что позволяет личинкам паразитоида закончить развитие. Все же, рано или поздно, парализованные личинки колонизируются различными микроорганизмами (Beard, 1952).

Таким образом, биологии *H. hebetor* и его использованию как агента биологического контроля посвящено достаточно много работ. Изучено влияние яда на некоторые физиологические системы и установлены отдельные компоненты яда. В тоже время существуют лишь единичные работы, рассматривающие восприимчивость парализованных насекомых к вторичным инфекциям.

1.1.3. Энтомопатогенные аскомицеты (Ascomycota, Нурocreales)

Энтомопатогенные аскомицеты известны с первой половины XIX века и являются первыми, описанными в литературе энтомопатогенными организмами. Микозы, вызываемые аскомицетами, часто встречаются в популяциях насекомых самых разных отрядов. На данный момент насчитывается более 100 родов и 700 видов энтомопатогенных аскомицетов (Sung et al., 2007). Благодаря способности энтомопатогенных грибов проникать через покровы насекомых их используют как контактные инсектициды (Thomas, Read, 2007; Борисов, 2009).

Энтомопатогенные аскомицеты эволюционно связаны с фитопаразитическими и эндофитными аскомицетами. В ряде работ по исследованию полных геномов энтомопатогенов *Mearhizium*, *Beauveria* и др. показано высокое сходство с эндофитными грибами (Wang et al., 2009; Gao et al., 2011; Hu et al., 2014). В настоящее время благодаря развитию молекулярно-генетических методов анализа были установлены родственные связи между телеоморфными (образующими половую стадию) и аморфными (утратившими ее) аскомицетами (Kepler et al., 2012). Предполагается, что утрата аскомицетами половой стадии (телеоморфы) и переход к клоновой изоляции имели большое значение для эволюции аскомицетов. Утрата телеоморфы привела к изменениям в ряде важнейших экологических характеристик. В частности, телеоморфные грибы имеют узкий круг насекомых-хозяев, определенную ценотическую приуроченность и характеризуются медленным развитием микозов у хозяев (Zhang et al., 2012, 2014). Напротив, анаморфные грибы способны поражать широкий спектр насекомых, заселять самые различные биоценозы и вызывать быстро протекающие микозы у насекомых. Однако, и среди анаморфных аскомицетов существуют виды с ограниченной специализацией. В работе Х. Ху с соавторами (Hu et al., 2014) на основе полногеномного секвенирования ряда видов *Metarhizium* показано, что в виды генералисты происходят от специализированных форм в результате морфо-физиологического прогресса, связанного с расширением семейств генов, кодирующих различные протеины, в том числе участвующих в гидролизе кутикулы насекомых. Интересно то, что токсины грибов, относящиеся к группе деструксинов продуцируются в основном видами генералистами *Metarhizium robertsii*, *M. anisopliae*, *M. brunneum*, *M. pingshaense*. Деструксины обладают выраженным иммуносупрессирующим и инсектицидным действием (Cavelier et al., 1998; Thomsen и Eilenberg, 2000), но их роль в развитии патогенов остается

дискуссионной (Cavelier et al., 1998; Wu et al., 1998; Vazquez et al., 2005; Pal et al., 2007).

Энтомопатогенные аскомицеты (как и многие другие группы грибов) имеют несколько типов спороношения, что обозначается термином плеоморфизм. Бесполое размножение характерно как для анаморфных так и телеоморфных аскомицетов и осуществляется конидиями. Этот тип спор образуется на воздушном мицелии грибов, который формируется на пораженных насекомых, или при поверхностном культивировании на искусственных питательных средах. Конидии распространяющихся воздушными или водными течениями, животными и др. Другой тип спор – аскоспоры, которые формируются только в результате полового процесса у телеоморфных видов в специальных органах – сумках, расположенных в плодовых телах. Для аскоспор характерен активный «отстрел» из плодовых тел. Третий тип спор - бластоспоры (или гифальные тела) представляют собой бесполое репродуктивные клетки грибов, образующиеся в гемолимфе насекомых при развитии патогенезов или при глубинном культивировании на питательных средах.

Инфекционный процесс в типичном случае при заражении конидиями грибов *Beauveria* и *Metarhizium* начинается с их адгезии на поверхности покровов путем формирования гидрофобных связей между липидами эпикутикулы и клеточными стенками конидий (Борисов и др., 2001; Wyrebek, 2013; Butt et al., 2016). В последующем происходит формирование ростовых трубок и аппрессориев. Для преодоления слоев кутикулы насекомого энтомопатогенный гриб продуцирует ряд гидролитических ферментов (липазы, протеазы и хитиназы), участвующие в деградации кутикулы (Charnley, 2003; Khachatourians, Qazi, 2008). В результате действия гидролитических ферментов происходит разрушение кутикулы насекомого с образованием полостей. Рядом авторов показаны коррелятивные связи между

активностью протеаз и вирулентностью микопатогенов (St. Leger, 1995; Leal et al., 1997; Castellanos-Moguel et al., 2007; Wang et al., 2002).

Пройдя кутикулярные слои и гиподерму, гриб попадает в гемоцель насекомого. При этом в гемолимфе образуются гифальные тела (или бластоспоры) гриба, которые разносятся с током гемолимфы по организму насекомого. На данной стадии развития микоза существенную роль могут играть токсины грибов (деструксины, боверицины, ооспореины и др.), которые подавляют реакции клеточного и гуморального иммунитета хозяев, препятствуя инкапсуляции гифальных тел (Charnley, 2003; Wang et al., 2012). При дальнейшей колонизации грибом органов насекомого в первую очередь гриб поражает жировое тело, затем кишечник, мальпигиевы сосуды, гиподерму, нервные волокна, мышцы и трахеи (Борисов и др., 2001). В это время происходит гибель насекомого. В некоторых работах (Борисов и др., 2001; Крюков, 2015) развитие инфекции от момента адгезии конидий до гибели называют патогенной стадией. После полной колонизации тела погибшего насекомого гриб начинает обратный рост гиф, к поверхности тела хозяина и, прорывая кутикулярные покровы, выходит на поверхность. На гифах образуются конидиеносцы и конидии, способные к инфицированию последующих хозяев. Период от гибели насекомого до формирования дочернего спороношения относят к некротрофной стадии (Борисов и др., 2001; Крюков, 2015).

Важно отметить, что успешное развитие грибов в инфицировании насекомых в значительной степени зависит от физиологического состояния хозяев. Ряд авторов предполагают, что энтомопатогенные аскомицеты поражают преимущественно насекомых, ослабленных различными стрессовыми воздействиями (Вейзер, 1972; Евлахова, 1974; Крюков, 2015; Boomsma et al., 2014). В частности для заражения условно «здоровых» насекомых необходимы огромные дозы конидий грибов - тысячи, и даже сотни тысяч конидий на одну особь (Jaronski, 2010; Ment et al., 2010;

Dubovskiy et al., 2013a; Kryukov et al., 2018a). Вероятность инфицирования насекомых такими высокими дозами в природе достаточно низка (Борисов и др., 2001). Однако, под действием таких факторов, как пониженная температура, сублетальные бактериозы, воздействие синтетических и природных инсектицидов, различных факторов, приводящих к онтогенетическим нарушениям происходит многократное повышение чувствительности к грибам и для инфицирования становятся достаточными довольно низкие дозы, вплоть до 50-100 конидий на особь хозяина (Крюков, 2015).

Известно, что энтомопатогенные аскомицеты, способны вносить существенный вклад в динамику численности насекомых, однако данный анализ затруднен из-за недостатка эмпирических данных, и слабой изученности факторов, определяющих возникновение вспышек грибных заболеваний (Hesketh et al., 2010). Эпизоотии, вызванные телеоморфными грибами, в связи с их локальным распространением обнаруживаются достаточно редко (Борисов, 2001; Kryukov et al., 2011; Zhang et al., 2012; Zhang et al., 2014), тогда как эпизоотии, вызванные аноморфными аскомицетами являются достаточно частыми событиями (Knudsen, Schotzko, 1999; Uma Devi et al., 2003; Chen et al., 2015; Mascarin et al., 2017 и др.). Однако, в большинстве случаев, не известно, что является причинами возникновения данных эпизоотий. Установлена существенная роль абиотических факторов, которые могут действовать как на патогенов, так и хозяев. Высокая относительная влажность $>90\%$ RH, определенный диапазон температур (20-30°C), низкий уровень УФ радиации – важнейшие условия для активного развития грибов на кутикуле насекомых (Борисов и др., 2001; Jaronski, 2010). Кроме того, под влиянием субоптимальных пониженных температур, насекомые могут становиться более восприимчивыми к грибам в десятки раз (Kryukov et al., 2018bc). Что касается биотических факторов, влияющих на развитие грибных эпизоотий, понимание данных механизмов

находится на начальном этапе. Известно, что голодание, вызванное недостатком корма, существенно повышает восприимчивость личинок колорадского жука *Leptionotarsa decemlineata* Say к грибам *B. bassiana* (Furlong, Groden, 2003). Т. Кабалук с соавторами (Kabaluk et al., 2017) показали, что в полевых условиях у проволочников уровень скрытой инфекции *M. brunneum* взаимосвязан с численностью кишечных бактерий *Pantoea agglomerans*, *Pandoraea pnomenusa*, *Nocardia pseudovaccinii* и *Mycobacterium frederiksbergense*. Присутствие всех указанных бактерий снижало смертность проволочников от *M. brunneum*. С другой стороны сублетальное (или полублетальное) заражение насекомых энтомопатогенными бактериями *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas* и др. приводит к существенному увеличению восприимчивости к грибам (Wraight, Ramos, 2005; Park, Kim, 2011; Yaroslavtseva et al., 2017). В начале прошлого десятилетия была обнаружена способность энтомопатогенных грибов (*Metarhizium*, *Beauveria*) колонизировать растения (Hu, St. Leger, 2002), что привело к резкому всплеску работ в данной области (обзоры: McKinnon et al., 2016; Jaber, Enkerli, 2017; Vamisile et al., 2018). Установлено, что указанные грибы образуют тесные взаимоотношения с растениями, связанные с обменом азота и фосфора (Behie et al., 2012; Krell et al., 2018), стимулируют рост растений, повышают их устойчивость к фитопатогенам и фитофагам (Ownley et al., 2010; Vamisile et al., 2018). Колонизация растений грибами, по всей видимости, оказывает существенное влияние на уровень гибели насекомых от микозов путем как непосредственного действия (через пероральное заражение насекомых гифальными телами грибов, находящихся в тканях растений), так и опосредованного (через изменение биохимических характеристик растений) (Vega et al., 2018). Роль паразитоидов в формировании грибных эпизоотий практически не изучалась.

В пространственно-временной динамике заболеваемости насекомых грибами важную роль играют пути распространения патогенов. Основные

пути горизонтальной трансмиссии приводятся в ряде обзоров (Roy, Pell, 2000; Jaronski, 2010; Baverstock et al., 2010). Пассивное распространение конидий грибов происходит при перемещении водных и воздушных масс, и почвенных членистоногих (коллембол и клещей). Также было зарегистрировано распространение *Metarhizium* с ростом корней растений (Keyser et al., 2014). Одним из наиболее важных путей передачи является миграция зараженных хозяев в новые места обитания. Конидии могут передаваться от зараженных к здоровым насекомым, например, в условиях высокой плотности или между самцами и самками при половых контактах (Peng et al., 2008). Существует ограниченное число работ, где показан перенос энтомопатогенных грибов среди определенных видов восприимчивых хозяев, насекомыми других (не восприимчивых или восприимчивых) видов. В частности, были зарегистрированы случаи передачи энтомофторовых грибов божьими коровками и муравьями в колониях тлей (Baverstock et al., 2010). Суздальская (1956) отметила передачу *B. bassiana* личинками златоглазок *Chrysopa ventralis* Curt клопам *Eurygaster integriceps* Puton. Пчелы и шмели способны осуществлять перенос конидий аскомицетов (*Beauveria*, *Mearhizium*) среди цветов, что приводит к заражению насекомых, питающихся пыльцой (Al-mazra'awi et al., 2006; Carreck et al., 2007). Роль паразитоидов в горизонтальном переносе энтомопатогенных грибов практически не изучена. Нам известна одна работа (Oreste et al, 2016), где показан перенос гриба *B. bassiana* эндопаразитоидом *E. formosa* в популяциях оранжерейной белокрылки *Aleurodes vaporariorum* Westwood. Авторами было показано, что самка паразитоида не была способна распознавать зараженных насекомых при этом являлась вектором передачи инфекции *B. bassiana*. Уровень горизонтального переноса гриба не превышал 26%.

Таким образом, энтомопатогенные аскомицеты представляют интерес с точки зрения биологического контроля экономически значимых

насекомых. В тоже время, вопросы, касающиеся механизмов развития естественных и искусственных эпизоотий, факторов, влияющих на восприимчивость насекомых к грибам изучены недостаточно. Особенно это касается различных биотических воздействий на насекомых. Важно отметить, что вопросы горизонтальной трансмиссии энтомопатогенных грибов паразитоидами изучены недостаточно.

1.2. Защитные системы насекомых

Как указывалось выше, ключевой фактор для успешного развития паразитических организмов – восприимчивость хозяина. К защитным механизмам насекомых, направленных против патогенов и паразитоидов относят комплекс факторов от поведенческих актов ухода от «врага» до молекулярных механизмов, приводящих к сдерживанию или гибели паразита. Основные системы защиты насекомых связаны с врождённым иммунитетом, однако роль адаптивной иммунной системы (т.е. приобретенного иммунитета) также активно обсуждается в настоящее время (Lanz-Mendoza, Garduco, 2018). Основные системы защиты насекомых можно разделить на внешние и внутренние. Последние можно разделить на две взаимосвязанные системы: клеточный иммунитет и гуморальный иммунитет (Глулов, 2001; Gupta, 2001; Iwanaga, Lee, 2005). Отдельно следует рассмотреть сообщества эндосимбионтов которые могут выполнять иммуномодуляторные функции или непосредственно взаимодействовать с патогенами и паразитоидами.

1.2.1. Внешние защитные системы

Первостепенным защитным фактором организма насекомого при контакте с паразитами являются его покровы. Особенно это важно для паразитоидов и энтомопатогенных грибов, так как при проникновении в организм хозяина они входят в непосредственный контакт с кутикулой.

Кутикула насекомого представляет собой серьезный механический барьер, большое значение имеет ее толщина и степень склеротизации (Глушов и др., 2001).

Кутикула насекомых состоит из нескольких слоев: 1) базальная мембрана – внутренний аморфный гранулярный слой, отделяющий гиподерму от полости тела; 2) гиподерма, представленная непрерывным однослойным рядом одно- или многоядерных клеток; 3) прокутикула, представляющая собой внутренний слой содержащий высокомолекулярный полисахарид - хитин; 4) эпикутикула, состоящая из кутикулина и воскового слоя, который в свою очередь состоит из жирных кислот, эфиров, углеводов, и других соединений (Nelson et al., 1999; Jarrold et al., 2007; Bogus et al., 2010).

В прокутикуле выделяют эндокутикулу, в которой полимерные молекулы хитиново-протеинового комплекса образуют чередующиеся слои, состоящие из тонких пластинок ламелл, и экзокутикулу, где данные слои стабилизируются хинонами и содержат пигменты, за счет которых кутикула насекомых становится более прочной и приобретает темный цвет (Тыщенко, 1986; Gullan, Cranston, 2010).

Эпикутикула неоднородна и состоит из несколько слоев, различающихся по химическому составу. Первый слой – протеиновый, состоит из белков и липидов. Верхняя часть данного слоя образована задубленным хиноном липопротеиновым комплексом – кутикулином. Следующий – восковой слой, защищает насекомых от потерь воды. Состав данного слоя зависит от вида насекомого и внешних условий, в которых они обитают, в основном он состоит из углеводов и продуктов их окисления. Сверху восковой слой покрыт последним - цементным слоем обеспечивающим механическую защиту, и также влияющим на водоудерживающую способность кутикулы. Состав данного слоя варьирует в зависимости от вида насекомого (Тыщенко, 1986)

Кроме свойств кутикулы как механического барьера, уровень резистентности насекомых в значительной степени зависит и от состава эпикутикулярных соединений. Так, известно, что ряд жирных кислот входящих в состав эпикутикулы (линолевая, олеиновая, пальмитиновая, стеариновая и др.) могут ингибировать прорастание конидий грибов, а алканы и полисахариды, напротив, стимулировать их адгезию и прорастание (Smith, Grula, 1982; Brey et al., 1993; Jarrold et al., 2007; Ment et al., 2013; Bogus et al., 2010). В частности, Д. Р. Саса-Гомез и соавторы (Sosa-Gomez et al., 1997) показали, что удаление углеводов С20-С31 с кутикулы клопа *Nezara viridula* Linnaeus гексаном приводило к 2.5-кратному уменьшению прикрепления конидий *Metarhizium*. А. Хайек и С. Эстберн (Hayek & Eastburn, 2003) выявили положительную корреляцию между гидрофобностью кутикулы у чешуекрылых и адгезией грибных конидий. Важно отметить, что углеводороды являются важным источником питательных веществ для энтомопатогенных грибов *M. robertsii* и *B. bassiana*. Эти соединения играют существенную роль в физиологии и патогенности грибов, определяя такие важнейшие свойства как способность к адгезии и проникновение через покровы (Pedrini et al., 2007; Huarte-Bonnet et al., 2017).

Одним из ключевых защитных механизмов от патогенов на уровне кутикулы является процесс меланизации, который опосредован действием профенолоксидазного каскада (Soderhall, Ajaxon, 1982; Hajek, St Leger, 1994). Фенолоксидаза (ФО) - это медьсодержащий фермент из класса оксидоредуктаз, окисляющий фенольные соединения. В организме насекомых ФО содержится в виде инактивированных проферментов в гемолимфе и кутикуле. Активация ФО в организме насекомых происходит при помощи сериновых протеаз, которые, активируются при взаимодействии с компонентами клеточных стенок микроорганизмов. Процесс активации профенолоксидазного комплекса и образования меланина подробно описан В.В. Глуповым с соавторами (2001). Повышенная активность ФО и как

следствие уровень меланизации покровов имеет положительную корреляцию с устойчивостью насекомых к различным энтомопатогенным грибам (Wilson et al., 2001; Dubovskiy et al., 2013b; Kerchev et al., 2017). Например, мутанты мушек *Drosophila*, несущие делеции, связанные с синтезом профенолоксидаз, были более восприимчивы к грибным инфекциям (Binggeli et al., 2014). Известно, что меланин токсичен для грибов и может ингибировать их прорастание и проникновение через кутикулу (St. Leger et al., 1988). Кроме того, при активации профенолоксидазного комплекса образуется ряд промежуточных высоко-реактивных продуктов, токсичных для микроорганизмов (Nappi, 1993). В недавнем исследовании Ф. Жанг и соавторы (Zhang et al., 2017) показали, что свежеперелинявшие личинки тутового шелкопряда *Bombyx mori* Linnaeus были устойчивы к грибковым инфекциям (*B. bassiana*) из-за высокой активности профенолоксидазы в линочной жидкости, находящейся на поверхности кутикулы. Однако вопрос о том, является ли процесс меланизации основным защитным механизмом от грибных инфекций, остается дискуссионным. Незначительное влияние меланизации и / или активности ФО на устойчивость насекомых к энтомопатогенным грибам было установлено в ряде исследований (Wilson et al., 2001; Dubovskiy et al., 2013b).

Помимо ФО, в кутикуле детектируется активность антимикробных пептидов (АМП) и ингибиторов металлопротеиназ (Brey et al., 1993; Butt et al., 2016). Показано, что при развитии микозов (*Metarhizium*, *Beauveria*) в кутикуле воштинной огневки существенно изменяется экспрессия РНК данных компонентов, что связано с уровнем устойчивости насекомых и видом патогена (Dubovskiy et al., 2013b)

1.2.2 Внутренние защитные системы

При проникновении паразита в гемоцель хозяина запускаются процессы, направленные на изоляцию и инактивацию патогенного

организма. Это реакции клеточного иммунитета (фагоцитоз, инкапсуляция и гранулообразование), а также целый комплекс механизмов, связанных с гуморальным иммунным ответом.

1.2.2.1 Клеточный иммунитет

Клеточный иммунитет включает, такие процессы как фагоцитоз, гранулообразование и инкапсуляцию (Strand and Pech, 1995; Schmidt et al., 2001). У насекомых описаны разные типы гемоцитов, при этом к основным типам, участвующим в данных процессах относятся гранулоциты и плазматоциты (Gupta, 1991; Gillespie et al., 1997; Глупов, 2001).

Роль фагоцитоза при инфекционном процессе широко описана и имеет существенное значение. Выделяют несколько стадий фагоцитоза. Первая стадия заключается в распознавании чужеродного агента. На этом этапе важную роль играют рецепторы гемоцитов и патоген-распознающие белки. Рецепторы образуют сигнальные пути, которые, в свою очередь, индуцируют процесс фагоцитоза и разрушение чужеродного агента (Jones et al., 1999; Глупов и др., 2001). На второй стадии происходят изменения мембраны и цитоскелета гемоцитов, образуются псевдоподии, окружающие фагоцитируемую частицу, после чего она перемещается в клетку, где при участии лизосом происходит лизис фагоцитированных частиц (Yeung et al., 2006). В результате фагоцитоза, главным образом, элиминируются проникшие в гемоцель микроорганизмы и измененные клетки самого организма хозяина. Считается, что фагоцитоз наиболее эффективен против бактерий (Ratcliffe and Walters, 1983; Dean et al., 2004; Neufeld et al., 2008). Так П. Деан и соавторы (Dean et al. 2004) показали, что гиперфагоцитарные плазматоциты табачного бражника (*Manduca sexta* Linnaeus) способны фагоцитировать до 500 бактерий. В ряде исследований показан фагоцитоз гифальных тел грибов *Beauveria* и *Metarhizium*, циркулирующих в гемолимфе, однако, грибы при этом способны прорасти из гемоцитов, образуя новые гифальные тела (Kurtti, Keyhani, 2008).

Инкапсуляция представляет собой иммунный процесс, направленный на изоляцию и элиминацию инородного объекта в полости тела насекомого. В результате вокруг инородного объекта образуется капсула, включающая в себя гемоциты, белки и меланин. Различают две формы инкапсуляции: непосредственно инкапсуляцию (когда размеры изолируемого объекта значительно превышают размеры гемоцитов) и гранулообразование (когда размеры объекта соотносятся с размерами гемоцитов) (Глупов и др., 2001).

Образование капсулы начинается с распознавания инородного объекта. Затем, происходит прикрепление гранулоцитов и плазматоцитов к поверхности инородного объекта, их активация и разрушение, вследствие чего выделяются коагулоген, различные адгезивные молекулы, антимикробные пептиды, компоненты профенолоксидазного каскада, хемотаксические факторы, привлекающие плазматоциты. Через некоторое время происходит объединение гемоцитов в гладкую многослойную капсулу (25 до 75 слоев) (Глупов и др., 2001, Gupta, 2001). Полностью сформированная капсула представляет собой заключенный в центре инородный объект, вокруг которого находится слой эумеланина и различных белков, после - сильно уплощенные клетки, а последний слой состоит из живых гемоцитов (Gupta, 2001). Капсула может выполнять функции механического барьера, а изолированные патогены могут погибать внутри капсулы, что может быть обусловлено наличием свободно радикальных соединений (Глупов и др., 2001). При грибных инфекциях инкапсуляция гифальных тел приводит к значительной задержке развития микоза (Wang St. Leger, 2006, Wang et al., 2012), и даже к выздоровлению насекомого (Kryukov et al., 2018b). Однако грибы с развитыми механизмами подавления иммунитета хозяина (р. *Metarhizium*, *Beauveria*) способны выживать в капсулах и прорасти из них в гемоцель благодаря действию гидролитических ферментов и токсинов, приводящим к разрушению гемоцитов (Wang et al. 2012; Butt et al., 2016). Также в процессе

инкапсуляции могут быть инактивированы яйца и личинок паразитоидов. В ряде работ (Daniel, 1997; Nouhuys et al., 2012; Luna et al., 2016) показано, что инкапсуляция способна приводить к гибели паразитоидов или существенной задержке их развития. В тоже время при паразитировании *Pseudapanteles dignus* Muesebeck на личинках *Tuta absoluta* Meyrick показано снижение количества инкапсулированных личинок в зависимости от численности личинок паразитоида в хозяине (Luna et al., 2016). При парализации насекомых эктопаразитоидами отмечается резкое падение уровня инкапсуляции (Kryukova et al., 2011; Vecchminazi et al., 2017).

1.2.2.2 Гуморальный иммунитет

Гуморальный иммунитет включает в себя процессы, связанные с активацией фенолоксидазного каскада, запуском синтеза антимикробных пептидов (АМП), ингибированием протеаз микроорганизмов, а также с запуском коагуляции, продукцией активированных кислородных метаболитов, активацией детоксицирующей и антиоксидантной систем и рядом других механизмов (Глулов и др., 2001; Butt et al., 2016; Lu, St. Leger 2016). В данном разделе мы рассмотрим только АМП, поскольку это один из ключевых параметров иммунитета насекомых при инфекциях и мы их частично касаемся при обсуждении результатов настоящей работы.

У насекомых известно большое количество различных АМП, которые синтезируются клетками гемолимфы, жирового тела, реже перикардальными клетками и клетками среднего кишечника (Bulet et al., 1999; Глулов и др., 2001; Lavigne, et al., 2005). В настоящее время известны следующие семейства АМП насекомых: дефензины, цекропины, дрозотины, аттацины, диптерицины, понерицины, метхивины и мелиттин (Wu et al., 2018). Часто, у антимикробных пептидов, синтезируемых насекомыми, наблюдается специфичность на определенную группу микроорганизмов, например, лизоцим катализирует гидролиз β -1-4-гликозидной связи между

остатками N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмураминовой кислоты пептидогликана клеточной стенки грамположительных бактерий (Мориг, Месснер, 1969; Smith et al., 1973). Следует отметить, что ряд АМП демонстрируют эффективность против грибов и вирусов (Bulet et al., 1999; Meister et al., 2000; Chen et al., 2018). У вошинной огневки известно 18 АМП, среди которых наиболее хорошо изученными являются, гловерин, галиомицин и галлеримицин, которые проявляют антибактериальную и/или антигрибную активность (Wojda, 2017). Гловерин показывает антибактериальную активность по отношению к грамотрицательным формам (Kaneko, et al., 2017) Галиомицин и галлеримицин являются преимущественно антигрибными компонентами (Wojda, 2017), однако повышение уровня их экспрессии у вошинной огневки наблюдается в ответ и на бактериальное заражение (Harding, 2012; Wojda, 2013; Dubovskiy et al., 2016). Интересно, что повышение уровня экспрессии галиомицина и галлеримицина коррелировало с разнообразием диеты и численностью бактерий в кишечнике *G. mellonella* (Krams et al., 2017). Более того, было установлено, что данные антигрибные пептиды способны взаимодействовать синергистически с другими АМП, подавляя численность бактерий (Moghaddam et al., 2016). В целом при грибных и бактериальных инфекциях насекомых, как правило, наблюдается подъем целого комплекса АМП, что обеспечивает более эффективную защиту от патогена, а также может быть связано с изменениями в численности симбионтной микрофлоры при патогенезах.

1.2.3. Роль микробиоты кишечника в защите от патогенов и паразитов

Микробиота кишечника играет существенную роль в физиологии насекомых, участвуя в пищеварении, регуляции иммунного ответа, детоксикации растительных метаболитов и инсектицидов, защите от

патогенных микроорганизмов, стресс реакциях, коммуникациях и других, жизненно важных функциях (обзоры: Engel and Moran, 2013; Douglas, 2015; Gressel, 2018). Нарушения в структуре сообщества микроорганизмов кишечника могут привести к увеличению восприимчивости к патогенным микроорганизмам и существенным изменениям в развитии заболеваний. Некоторые условные патогены в кишечнике могут проявлять патогенные свойства при развитии различных патологических состояний, в том числе при инфекциях (Broderick et al., 2006; Mason et al., 2011; Wei et al., 2017). Влияние кишечной микробиоты на развитие патогенезов было достаточно полно изучено для бактериозов, вызываемых *Bacillus thuringiensis* (Broderick et al., 2006; 2009; Mason et al., 2011; Caccia et al. 2016; Johnston, Crickmore 2009; Dubovskiy et al., 2016; Grau et al., 2017). Авторами показано, что микробиота, ассоциированная с кишечником хозяина, существенно влияет на вирулентность *B. thuringiensis*. Устранение кишечного микробного сообщества «антибиотическим коктейлем» снижает инсектицидность *B. thuringiensis* для чешуекрылых, хотя данный вопрос остается дискуссионным. Влияние кишечных бактерий на развитие микозов изучено значительно меньше. Хорошо известно, что кишечные бактерии могут ингибировать рост и спорообразование грибов *in vitro* (Blackburn et al., 2008; Sivakumar et al., 2017). Поэтому, насекомые с подавленной антибиотиками кишечной микробиотой оказываются более восприимчивы к энтомопатогенным аскомицетам при пероральном заражении (Zhang et al., 2018). Бактерии, находящиеся в слюне короеда *Dendroctonus rufipennis* Kirby, способны ингибировать рост условно-патогенных грибов, присутствующих в ходах насекомого, и оказывающих негативное воздействие на его выживаемость (Cardoza et al., 2006). С другой стороны, в недавних работах показано, что топикальное (перкутанное) инфицирование энтомопатогенными грибами приводит к существенным перестройкам в микробиоме. В частности, Г. Уэй с соавт. (Wei et al., 2017) показали, что заражение грибом *B. bassiana* личинок

комаров *Anopheles* приводит к изменению антимикробной активности кишечника, уменьшению разнообразия бактериального сообщества кишечника за счет увеличения обилия бактерии *Serratia marcescens*, что приводит к снижению устойчивости к грибу. Также известно, что бактериальные инфекции *B. thuringiensis* у колорадского жука приводят к изменениям свойств кутикулы, связанных с защитой от грибных патогенов (Yaroslavtseva et al., 2017), что может быть опосредованно связано с дисбиозом в кишечнике при заражении *B. thuringiensis*. В настоящее время высказываются гипотезы о том, что у насекомых имеется обратные коррелятивные связи между активностью иммунных реакций в органах и тканях, через которые происходит проникновение патогенов. В частности, скормливание антибиотиков личинкам воштинной огневки и снижение, таким образом, численности бактерий приводит к повышению уровня инкапсуляции (Krams et al., 2017) - механизма связанного с защитой от грибных патогенов. По-видимому, микроорганизмы, проникающие через покровы и кишечник, воздействуют друг на друга по принципу прямой и обратной связи через организм насекомого. Однако работы, описывающие данные взаимодействия единичны (Wei et al., 2017).

Исследования взаимосвязи между паразитоидами и микробиотой насекомых-хозяев проводились в основном на моделях, включающих эндопаразитоидов и тлей. В большинстве случаев эти исследования были сосредоточены на защитных функциях эндосимбионтов, направленных против паразитоидов (обзор: Kaltenpoth & Engl, 2013). В частности, было показано, что факультативные симбионты тлей (*Aphis fabae* Scopoli, *Aphis pisum* Harris), а именно энтеробактерии *Hamiltonella defense*, защищают хозяев от эндопаразитоида *Aphidius ervi* Haliday (Oliver et al., 2005, 2009; Guay, et al., 2009). Интересно, что гибель личинок эндопаразитов внутри тела тлей обусловлена синтезом токсина, кодируемого бактериофагом *H. defense* (Oliver et al., 2009). Сходным образом, симбиотическая

энтеробактерия *Regiella insecticola* обеспечивает защиту тлей от эндопаразитических ос *Aphidius colemani* Viereck и *A. ervi* (Vorburger et al., 2010; Hansen et al., 2013). Напротив, положительная корреляция между частотой заражения бактериальными симбионтами и уровнем зараженности паразитоидами была показана для системы, включающей энтеробактерии *Arsenophonus*, эндопаразитоида *Psyllaephagus bliteus* Riek и хозяина *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hansen et al., 2007). Также примером защиты насекомого от паразитоидов *Leptopilina heterotoma* Thomson служит работа Дж. Ксие и соавт. (Xie et al., 2011) на *Drosophila hydei* Sturtevant. В данной работе эндосимбиотическая бактерия *Spiroplasma* увеличивала выживаемость хозяина, при этом развитие личинок паразитоидов значительно нарушалось. Отношения между хозяевами, их симбиотическими бактериями и эктопаразитоидами, а также влияние паразитоидов на структуру микробиоты насекомых-хозяев не изучались.

Таким образом, защитные системы насекомых многокомпонентны, а деление иммунитета насекомых на клеточный и гуморальный является довольно условным. Следует отметить, что иммунная система насекомых далеко не ограничивается рассмотренными в данном разделе реакциями. Изучение роли кишечной микробиоты в защите от микопатогенов и паразитоидов находится на начальном этапе. Весьма интригующим является вопрос о смене бактериальных сообществ в кишечнике насекомых-хозяев под действием патогенов и паразитов, проникающих через кутикулу. Вполне возможно, что различный видовой состав микрофлоры будет модулировать иммунный ответ, связанный с вторжением паразитоидов и развитием грибных инфекций.

1.3. Взаимодействия в трехкомпонентных системах насекомые-хозяева – паразитоиды – энтомопатогены

Работы по механизмам взаимоотношений организмов в трех-компонентных системах насекомые-хозяева – паразитоиды – энтомопатогенные грибы отрывочны и касаются преимущественно систем, включающих эндопаразитоидов. Исследования в этой области были посвящены преимущественно воздействию энтомопатогенов на паразитоидов как на нецелевых насекомых, их совместному использованию в интегрированной защите растений (Flexner et al., 1986; Roy, Pell, 2000; Lord, 2001; Rashki et al., 2009). Было показано, что конкурентные взаимодействия между паразитоидами и энтомопатогенами в организме хозяев чаще всего складываются в пользу микроорганизма (Hochberg, Lawton, 1990). При этом установлено, что исход в этих отношениях зависит от интервала времени между откладкой яиц паразитоидом в (на) хозяина и его инфицированием грибами (King, Bell, 1978; Powell et al., 1986; Fuentes-Contreras et al., 1998; Furlong, Pell 2000; Mesquita, Lacey, 2001). На поздних стадиях развития паразитоида на хозяине, оба звена системы, как правило, менее восприимчивы к энтомопатогенам.

Важно отметить, что паразитоиды, взаимодействуя с иммунитетом хозяев, использует множество сложных механизмов - от молекулярно-клеточной мимикрии до использования симбиотических вирусов (у Braconidae и Ichneumonidae) для подавления защитных систем (Edson et al., 1981; Luckhart et al., 1996; Nakaguchi et al., 2006; Takahashi-Nakaguchi, 2010, 2011; Richards et al., 2011; Nishikawa et al., 2013). В свою очередь, снижение иммунитета насекомого хозяина может приводить к увеличению восприимчивости к различным вторичным инфекциям, в том числе энтомопатогенным грибам. Установлено, что при инъекциях яда *Pimpla hypochondriaca* Retz. (Ichneumonidae) личинкам капустной совки *Mamestra brassicae* Linnaeus у последних наблюдалось замедление развития, снижение скорости роста, а также повышение восприимчивости к бактериям *Bacillus cereus* и грибам *B. bassiana* (Dani et al., 2004; Richards et al., 2011). В.Р. Ел-

Суфти и Е. Фухнер (El-Sufy, Führer 1981a, b) обнаружили, что заражение паразитоидами *Apanteles glorneratus* Linnaeus личинок белянки *Pieris brassicae* Linnaeus усиливает проникновение гриба *B. bassiana* через кутикулу гусениц. Однако после проникновения гриба через покровы микоз развивается намного медленнее из-за фунгистатических свойств гемолимфы, что было связано с присутствием в ней личинок *Apanteles*. Сходные тенденции были отмечены этими же авторами (El-Sufy, Führer 1981b, 1985) на модели *Cydia pomonella* Linnaeus (Tortricidae) – *Ascogaster quadridentatus* Wesmael – *B. bassiana*. При заражении капустной моли *Plutella xylostella* Linnaeus грибами *B. bassiana*, *M. anisopliae* и эндопаразитоидом *Oomyzus sokolowskii* Kurd (Eulophidae) наблюдалось снижение уровня паразитирования *O. sokolowskii* и увеличение восприимчивости хозяина к указанным энтомопатогенным грибам (Dos Santos et al., 2006). В работе М. Дж. Фурлонг и Дж. К. Пелл (Furlong, Pell, 2000) при совместном развитии паразитоидов (*Diadegma semiclausum* Hellen; *Cotesia plutellae* Kurdjumov) и гриба *Zoophthora radicans* наблюдалось значительное уменьшение количества коконов паразитоидов на хозяине *P. xylostella*. В данном исследовании паразитоид не был способен распознавать зараженных и здоровых насекомых. Сходные данные получены на тлях при паразитировании *Aphidius matricariae* Haliday и *Aphelinus asychis* Walker. Было показано, что при совместном паразитировании и заражении грибом *Beauveria bassiana* тли погибали от микоза, вместе с паразитоидами, при этом если заражение грибом происходило после атаки паразитоида, количество насекомых погибших от микоза значительно сокращалось (Mesquita et al., 2002; Rashki et al., 2009).

Гораздо меньше внимания уделено инфекциям, возникающим у насекомых, пораженных эктопаразитоидами. Это, по-видимому, связано с тем, что при атаке эктопаразитоиды вызывают парализацию и остановку

развития насекомого-хозяина. Соответственно, данные насекомые уже не могут питаться и наносить повреждения растениям или хранящимся продуктам. Исследования по изменению чувствительности воцинной огневки к грибным патогенам при парализации и паразитировании *H. hebetor* проводились в Институте защиты растений Костинбрда (Болгария), а также нашей лабораторией (лаборатория патологии насекомых Института систематики и экологии животных СО РАН). Первая группа (Valevski, Draganova, 2000; Draganova, Valevski, 2000) не обнаружила повышения чувствительности парализованных браконом гусениц к грибу *B. bassiana*, что возможно было связано с использованием высоких доз патогена (LT_{90} – 6 сутки). Нашей лабораторией были использованы различные виды и штаммы энтомопатогенных грибов с разным уровнем вирулентности, при этом тестировался значительный диапазон концентраций конидий (Kryukov et al., 2013). Было установлено, что после парализации у гусениц огневки катастрофически увеличивается восприимчивость к широко-специализированным грибам *Metarhizium robertsii* (штаммы Mak-1, P-72), *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea*, *B. bassiana*. В частности, LC_{50} конидий *B. bassiana* снижалась у парализованных гусениц почти в 5000 раз (Kryukov et al., 2013). Для успешного течения микоза становилась достаточной доза 10^2 конидий на одну особь, тогда как подобные инфекционные нагрузки были абсолютно не способны вызвать микозы у не парализованных насекомых. Восприимчивость к грибным инфекциям повышалась как при инфицировании «свеже-парализованных» хозяев, так и, напротив, при парализации уже инфицированных гусениц (парализация через 2 суток после инфицирования грибом). Важно отметить, что присутствие или отсутствие личинок бракона, питающихся на гусеницах *G. mellonella*, не влияло на исход грибного заболевания и продукцию дочерней инфекции конидий грибов (Kryukov et al., 2013). Кроме того, было показано, что самки паразитоидов, инокулированные суспензией конидий гриба *B. bassiana* способны успешно

инфицировать грибом личинок огневки, при этом было достаточно невысоких доз для инокуляции паразитоидов ($LC_{50} - 10^4$ конидий/мл) (Крюков, 2015; Kryukov et al., 2018a). Сами паразитоиды (личинки и имаго) были весьма восприимчивы к энтомопатогенным грибам и, как правило, погибали от грибных инфекций вместе с хозяином (Kryukov et al., 2013).

Исследователи предположили, что повышение чувствительности к грибам у гусениц, парализованных браконами, обусловлено ингибированием систем, связанных с защитой от грибных инфекций под влиянием яда паразитоида (Kryukov et al., 2013), а именно – с резким снижением показателей клеточного иммунитета и уровня фенолоксидазы в гемолимфе, отмечавшимися Н.А. Крюковой (Kryukova et al., 2011). Также было предположено, что парализованные браконом гусеницы, по сравнению с нативными, получают более высокие дозы конидий грибов, поскольку они лишены возможности очистки от конидии во время движения, например, при контакте с кормовым субстратом (Kryukov et al., 2013). Однако, затем, сравнение уровня адгезии конидий на парализованных и контрольных гусеницах показало несущественные различия, при слабой тенденции к увеличению адгезии на парализованных личинках (Kryukov et al., 2018a). В тоже время было установлено, что на кутикуле парализованных гусениц наблюдается более активное прорастание гриба (в 4 раза выше по сравнению с не парализованными) (Kryukov et al., 2018a). Причины активации прорастания оставались не выясненными, до настоящего времени.

Таким образом, паразитирование и заражение грибом насекомого-хозяина может приводит к конкуренции между паразитоидом и энтомопатогеном. В данных взаимоотношениях микроорганизм, как правило, имеет конкурентное преимущество над паразитоидом. Паразитоид приводит к ослаблению иммунитета насекомого хозяина, сохраняя его на определенном уровне для того, чтоб избежать инфекций вызванных

патогенами (бактериальными или грибными). Спорадические работы в данной области были выполнены на системах с участием эндо-, но не эктопаразитов. Ранее в нашей лаборатории получены интригующие результаты о катастрофическом падении резистентности к энтомопатогенным грибам-генералистам у личинок вощинной огневки, парализованных габробраконом. В тоже время причины данного повышения оставались на уровне предположений. Не было исследовано совместное действие паразитов и энтомопатогенных грибов на параметры иммунитета хозяев. Открытым оставался вопрос об изменении чувствительности парализованных гусениц к грибам с разным уровнем специализации (генералистам, специалистам, условным патогенам). Кроме того, поскольку самки *H. hebetor* парализуют избыточное количество личинок хозяев, перспективным представлялось исследование возможности горизонтального переноса энтомопатогенных грибов от инфицированных личинок к здоровым, посредством *H. hebetor*.

1.4. Заключение

На данный момент исследование взаимодействий в 3-х компонентных системах насекомые-хозяева — паразиты — энтомопатогены находится на начальном этапе. Данные системы привлекают внимание исследователей с точки зрения физиологических, иммунологических, экологических и прикладных аспектов. Показано, что паразиты способны ослаблять иммунитет насекомого, что может стимулировать развитие инфекций, в том числе, вызванных энтомопатогенными грибами. Однако, остается открытым вопрос о том, как при этом изменяется восприимчивость хозяев к патогенам с разным уровнем специализации. В литературе достаточно глубоко освещены физиологические механизмы насекомых, направленные на инактивацию патогенов и паразитов. В настоящее время установлено влияние яда паразитов на важнейшие параметры клеточного и гуморального

иммунитета хозяев, но не ясно каковы особенности иммунного ответа при комплексных инфекциях/инвазиях. Не известно каким образом изменяется микрофлора кишечника хозяев при парализации и оказывает ли она влияние на развитие грибных инфекций. Вопрос о механизмах и эффективности горизонтального переноса энтомопатогенов паразитоидами также остается открытым.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В экспериментах использовали насекомых лабораторной популяции *Galleria mellonella* западно-сибирского происхождения. Насекомых содержали при температуре 28°C на искусственной питательной среде следующего состава: кукурузная крупа 90 г, пшеничная мука 40 г, дрожжи 10 г, молоко сухое 50 г, воск 50 г, мёд 50 г, глицерин 50 г, вода 50 мл (Тамарина, 1987). В работе использовали лабораторную популяцию паразитоидов *N. hebetor*, которых выращивали на личинках 5–6-го возрастов *G. mellonella*. Паразитоидов содержали при 25°C и 14 ч фотопериоде. Имаго паразитоидов подкармливали 12%-ным раствором меда (Kryukova et al., 2011).

В опытах использовали культуры грибов из коллекции микроорганизмов ИСиЭЖ СО РАН и ВИЗР: *B. basiana* (изолят Sar-31), *Metarhizium robertsii* (изолят MB-1), *Scopulariopsis brevicaulis* (изолят Sliz-1), *Aspergillus flavus* (изолят AF-1), *Fusarium oxisporum* (изолят F-1), *Penicillium* sp. (изолят Pen-1), *Lecanicillium muscarium* (изолят VI-24), *Metarhizium pemphigum* (изолят Mak-2) и *C. militaris* (изолят CNF).

Конидии для заражения получали на декстрозном агаре Сабуро (пептон 2.5 г, дрожжевой экстракт 2.5 г, декстроза 10 г, агар-агар – 15 г, дистиллированная вода – 1 л) при культивировании при 26°C в течение 14 дней. Конидии собирали при помощи шпателя со спорообразующих культур, высушивали при 25°C и 15% RH в течение недели и хранили в холодильнике при 4°C. Бластоспоры грибов получали методом глубинного культивирования на вышеуказанной среде без агара в 500 мл колбах. Колбы встряхивали в шейкере-инкубаторе (160 об./мин) при температуре 25°C в течение 5 суток. Бластоспоры отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (8000 g) и хранили при -20°C. Для получения аскоспор использовали модифицированную технику Х. Сато и М. Шимацу (Sato & Shimazu, 2002). Каждой куколке вощинной огневки инъецировали 3-мкл

суспензии содержащей 2×10^4 бластоспор и помещали в пластиковый контейнер (350 мл) со слоем увлажненного сфагнома толщиной 25-30 мм. Контейнеры инкубировали при 20°C, фотопериоде 12:12 ч. и относительной влажности 80% в течение 25–32 дней до образования перитециев. Затем каждую строму помещали в стеклянную пробирку (10 мл) для сбора аскоспор (Kryukov et al., 2018b). Пробирки с аскоспорами хранили при +4°C. Для подсчета концентраций спор грибов и заражения насекомых конидии и аскоспоры суспендировали в водном растворе Tween-20 (0.03%), а бластоспоры в физрастворе. Концентрации конидий, бластоспор и аскоспор подсчитывали с помощью гемоцитометра.

2.2. Общий экспериментальный дизайн

Для изучения взаимодействий в трёхкомпонентной системе *G. mellonella* – *H. hebetor* – энтомопатогенные грибы были использованы шесть блоков экспериментов. Схема основных экспериментов представлена на рисунке 1. Для постановки данных экспериментов использовали парализованных и не парализованных личинок воцинной огневки. Для парализации к личинкам огневки пятого возраста подсаживали самок паразитоида. Через 6–8 ч парализованных личинок извлекали и протирали увлажненным водой ватным тампоном для того, чтоб убрать с кутикулы личинок огневки отложенные паразитоидом яйца (Kryukov et al., 2013). Затем личинок огневки инфицировали грибами. Использовали преимущественно топикальное заражение в дозах сублетальных для не парализованных личинок, но летальных для парализованных гусениц огневки. В отдельных экспериментах использовали инъекцию грибов в гемоцель. Учет смертности от грибных инфекций проводили в течение 10-12 суток. Анализ физиологических показателей насекомых, изменений в кишечной микробиоте, динамики накопления токсинов грибов проводили на начальных этапах развития микозов (в течение 2–4-х суток после инфицирования).

2.3. Анализ восприимчивости парализованных насекомых к энтомопатогенным грибам с разным уровнем специализации и сапротрофам.

Для оценки восприимчивости к грибам с разной специализацией использовали конидии сапротрофных и условно патогенных аскомицетов



Рисунок 1. Схема основных экспериментов.

S. brevicaulis, *A. flavus*, *F. oxisporum*, *Penicillium* sp., конидии анаморфных энтомопатогенов с широкой специализацией, поражающих многих насекомых из разных отрядов *B. basiana*, *M. robertsii*, а также конидии анаморфных грибов с ограниченной специализацией *L. muscarium* (патоген белокрылок и тлей), *M. remphigum* (патоген тлей) и аскоспоры *C. militaris* (телеоморфный вид, патоген чешуекрылых). Пять мкл суспензии с концентрацией 1×10^8 спор/мл наносили на брюшко парализованных и здоровых личинок ($n = 30$) с помощью автоматического дозатора. Затем насекомых инкубировали в чашках Петри при 25°C, 100%-ной RH в темноте в течение 12 суток. Погибших личинок разрезали и детектировали формирование склероциев (плотных сплетений гиф в гемоцеле), после чего раскладывали их во влажные камеры для прорастания грибов.

2.4. Изучение эффективности горизонтальной передачи энтомопатогенного гриба паразитоидом

Основная схема эксперимента по передаче паразитоидами энтомопатогенных грибов от зараженных личинок *G. mellonella* к здоровым представлена на Рис. 2.

Каждую личинку огневки погружали на 10 секунд в водно-твинную суспензию конидий *B. bassiana* с концентрациями 10^6 , 10^7 и 10^8 конидий/мл, после чего личинки подсушивались на фильтровальной бумаге в течение 20 с и помещались в чашки Петри (90 мм). Контрольные личинки *G. mellonella* обрабатывались водным раствором Tween 20 (0.03%).

Через 6ч. после инокуляции грибами (этап адгезии) каждую личинку перемещали в стерильную чашку Петри (60 мм) и подсаживали одну самку паразитоида. После парализации (8–12 ч совместного содержания) каждую самку паразитоида перемещали в 90-мм чашку Петри с группой из 10 интактных личинок огневки. Через 12 ч. паразитоида удаляли и помещали



Рисунок 2. Схема основного эксперимента по передаче энтомопатогенного гриба от зараженных личинок *G. melonella* к здоровым через паразитоида *H. hebetor*.

диск стерильной фильтровальной бумаги увлажненный 0.8 мл стерильной дистиллированной воды. Использовали не менее 9 повторностей (9 личинок в качестве источников инфекции и 90 личинок в качестве реципиентов гриба) на каждую концентрацию. Смертность личинок огневки от *B. bassiana* регистрировали в течение 12 дней. По результату опыта оценивали следующие параметры: 1) способность паразитоидов к парализации, т.е. количество парализованных личинок огневки; 2) процент случаев успешной трансмиссии (если хотя бы одна из десяти личинок огневки в чашке Петри погибала от гриба, трансмиссию считали случившейся) 3) среднее

количество личинок в чашках Петри, которые погибли от микоза в результате передачи конидий самкой паразитоида.

Для того чтобы установить уровень распространения грибной инфекции в группах личинок огневки с определенным процентом зараженных особей был проведен следующий эксперимент. Личинок огневки заражали конидиями *B. bassiana* (концентрации – 10^6 , 10^7 и 10^8 конидий/мл), также как было описано выше. Через шесть часов после инокуляции инфицированных и нативных личинок помещали вместе в чашки Петри 90 мм в соотношении четыре заражённых и шесть не заражённых личинок, то есть в каждой повторности было инфицировано грибом 40% особей. После этого в каждую чашку подсаживали две самки паразитоида. Через двенадцать часов инкубации в чашки были помещены увлажненные диски фильтровальной бумаги (800 мкл дистиллированной воды на один диск). Смертность от грибов регистрировали в течение двенадцати дней. Десять повторностей на каждую концентрацию (100 личинок вошинной огневки и 20 самок паразитоида) было использовано в эксперименте.

Для понимания механизмов инфицирования личинок конидиями грибов при переносе паразитоидом были проведены следующие эксперименты. Чтобы выяснить насколько необходима инъекция конидий в гемоцель огневки яйцекладом паразитоида, или же достаточным является лишь поверхностный контакт, выполнены два варианта заражения. В первом варианте к нативным личинкам *G. mellonella* подсаживали самок паразитоида инфицированных конидиями *B. bassiana* в концентрации 10^5 конидий/мл. Во втором варианте личинок *G. mellonella* парализовали с помощью не заражённых самок *H. hebetor*, а затем подсаживали самцов *H. hebetor* заражённых такой же концентрацией гриба. В качестве контрольных групп использовали личинок *G. mellonella* парализованных нативными самками паразитоида. Все личинки и паразитоиды содержались индивидуально в 60 мм чашках Петри. Смертность от микоза зарегистрировалась в течение 12

дней. В каждом варианте использовалось не менее 60 личинок вощинной огневки и 60 паразитоидов.

Помимо этого проведен дополнительный эксперимент для оценки уровня передачи инфекции через контаминацию самками паразитоида чашек Петри конидиями гриба. Самок *H. hebetor* инокулировали грибом (10^7 конидий/мл) и помещали в 60 мм чашки Петри с личинками вощинной огневки (1 личинка огневки и 1 паразитоид в одной чашке). Во втором варианте самок паразитоида заражённых той же концентрацией гриба, помещали в пустые чашки Петри, встряхивали в течение 10 минут и инкубировали в течение 12 ч. Затем самок паразитоида извлекали, и в эти чашки Петри помещали нативных самок паразитоида и личинок вощинной огневки (1 личинка огневки и 1 паразитоид в одной чашке). В качестве контрольных групп использовали личинок *G. mellonella* парализованных нативными самками паразитоида. После этого проводили инкубацию и учет смертности, как описано выше. Использовали не менее 40 повторностей на каждый вариант.

2.5. Изменения защитных систем огневки при парализации ядом и заражении грибами

2.5.1. Биохимические свойства эпикутикулы и влияние эпикутикулярных экстрактов на рост грибов.

Ранее было показано резкое усиление прорастания конидий на кутикуле парализованных гусениц (Крюков, 2015). Для выяснения причин данного явления была поставлена серия экспериментов. Мы оценивали прорастание конидий энтомопатогенного гриба *B. bassiana* на неполярном и полярном эпикутикулярных экстрактах. Полярные экстракты кутикулы характеризуются преобладанием жирных кислот, а неполярные экстракты - доминированием углеводов (Jarrold et al., 2007; Ment et al., 2010). Экстракты получены нами путем смыва кутикулярных соединений личинок

н-гексаном (неполярная фракция) и дихлорметаном (полярная фракция) по методике, предложенной Д. Мент с соавт. (Ment et al., 2010). Десять парализованных (2 сут после парализации) и десять не парализованных личинок *G. melonella* встряхивали (150 об./мин) в 50 мл хроматографически чистого н-гексана в течение 5 минут. Затем н-гексан переносили в чистую пробирку, а личинок погружали в 50 мл дихлорметана (98%) и снова встряхивали (150 об/мин) в течение 5 мин. Экстракты дихлорметана и н-гексана выпаривали при 26°C. Концентрированные образцы (500 мкл) наносили на поверхность 2% агарозы (GQT) в чашки Петри из расчета – экстракт с поверхности одной личинки на 1 см² поверхности агарозы. Затем на агарозу с экстрактами наносили водные суспензии конидий гриба *B. bassiana* и подсушивали при комнатных условиях в течение 30 мин. Уровень прорастания конидий подсчитывали с помощью светового микроскопа Axioscop 40 «Zeiss» после 24 часовой экспозиции при 25°C и 99%RH в темноте. Эксперименты проведены в 3-х повторностях. В каждой подсчитано не менее 100 конидий.

Для оценки содержания мажорных жирных кислот и углеводов был сделан смыв с эпикутикулы нативных и парализованных личинок огневки (2 сут после парализации). В качестве растворителя использован 98% н-гексан, поскольку именно н-гексановая фракция показала существенное различия в прорастании (см. ниже, раздел 3.3.1.). Сорок пять гусениц воцинной огневки помещали в 45 мл н-гексана на 5 минут, встряхивая в шейкере (150 об/мин). Затем личинок удаляли и растворитель упаривали в роторном испарителе. Для парализованных и не парализованных личинок использованы 3-х повторности по 45 личинок в каждой.

Работа по идентификации соединений и их количественному анализу проводилась совместно с лабораторией Экологических исследований и хроматографического анализа Института органической химии им. Ворожцова (СО РАН). Количественное определение свободных жирных

кислот и углеводов проводили методом хроматомасс-спектрометрии на газовом хроматографе «НР» 6890 с масс-селективным детектором «НР» 5975. Перед анализом свободные жирные кислоты переводили в метиловые эфиры с помощью диазометана (Golebiowski et al., 2008). Сухой остаток растворяли в гексане и использовали для анализа содержания углеводов и жирных кислот в экстракте методом ГХ/МС. Использовали кварцевую капиллярную колонку HP-5MS (сополимер 5% бифенил- и 95% диметилсилоксана) длиной 30 м и внутренним диаметром 0.25 мм, толщина пленки неподвижной фазы 0.25 мкм. В качестве газа носителя использовали гелий, скорость потока 0.8 мл/мин. Температура инжектора и интерфейса составляла 280°C, температура колонки менялась по следующей программе: 2 мин выдерживалась при 50°C, затем увеличивалась до 280°C, со скоростью 10°C/мин и сохранялась при этой температуре в течение 20 мин.

Идентификацию соединений проводили сравнением времен удерживания заведомых образцов метиловых эфиров жирных кислот и углеводов и сопоставлением полных экспериментальных масс-спектров с масс-спектрами из базы данных NIST 02 MS (175000 соединений, находящейся в составе системы обработки данных Agilent G 170 1 AA Chemstation). Содержание компонентов рассчитывали с помощью стандартных образцов миристинового спирта (внутренний стандарт), метилового эфира стеариновой кислоты и н-октакозана с учетом коэффициентов чувствительности.

2.5.2. Активность фенолоксидаз (ФО)

Мы анализировали активность фенолоксидазы (ФО) в покровах, поскольку уровень ФО в кутикуле является важнейшим параметром защиты личинок вощинной огневки от грибных инфекций (Dubovskiy et al., 2013b; Kryukov et al., 2018c). Заражение парализованных и не парализованных насекомых проводили путем погружения в суспензию *B. bassiana* с

концентрацией 1×10^6 конидий/мл. В качестве контрольных групп использовались не инфицированные (парализованные и не парализованные) насекомые. Уровень ФО в кутикуле личинок оценивали через 24 и 48 ч после заражения. Кутикулу личинок вошинной огневки выделяли в 0.1М фосфатный буфер (ФБ), рН 7.2 и очищали от остатков жирового тела при помощи шпателя, после чего три раза промывали на вортексе в 500 мкл ФБ. Затем кутикулу гомогенизировали в 200 мкл ФБ (2 мин при 6.5 М/с на гомогенизаторе FASTPREP® 24 (MP Biomedicals, США). Гомогенат центрифугировали в течении 10 мин при 10000 g (4°C). Супернатант использовали для спектрофотометрического определения активности ФО. Измерения проводили в 200 мкл 10 мМ 3.4-дигидроокси-L-фенилаланина, через 6 ч инкубации при 28°C. Фенолоксидазную активность оценивали по образованию меланина при длине волны 490 нм (Ashida, Söderhäll, 1984; Dubovskiy at al., 2013b). Активность ферментов выражали в единицах измерения оптической плотности (ΔA) инкубационной смеси в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка. Концентрацию белка в образцах насекомых определяли по методу М. Бредфорда (Bradford, 1976). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин. Для анализа использовали 10 образцов каждого варианта (1 образец = кутикула 3-х личинок).

2.5.3. Уровень инкапсуляции

Парализованных и не парализованных личинок вошинной огневки заражали путем погружения в суспензию конидий *B. bassiana* как описано в предыдущем разделе (2.5.2.). Уровень инкапсуляции измеряли через 24 и 48 ч после инфицирования. Для этого в гемоцель насекомого, через прокол вентрального сегмента в кутикуле, помещали нейлоновый имплантат длиной 2 мм и диаметром 0.5 мм. Через два часа имплантаты извлекали из полости тела личинок и фотографировали с трех сторон при помощи светового

микроскопа Stemi 2000 «Zeiss». Степень потемнения имплантата определяли с помощью компьютерной программы Image J (Rantala, Roff, 2007). Результаты представлены как разницы в степени потемнения экспериментальных и контрольных (не погруженных в гемоцель насекомого) имплантатов, выраженные в условных единицах компьютерной программы. Для анализа использовалось не менее 45 насекомых каждого варианта эксперимента.

2.6 Динамика накопления грибных токсинов у парализованных и не парализованных личинок воцинной огневки

Данная работа проводилась с использованием гриба *C. militaris* поскольку метаболиты данного гриба представляют интерес с точки зрения их вклада в вирулентность патогена. Кроме того в предварительных экспериментах нам удалось детектировать его токсины (кордицепин, кордицепиамиды) в зараженных личиках *G. melonella*. В эксперименте использовали инъекции бластоспор гриба в гемоцель для выравнивания стартовых условий патогенеза. Парализованных и не парализованных личинок инъецировали 3 мкл физраствора, содержащими 10 тыс. бластоспор. Контрольных личинок инъецировали 3 мкл физраствора. Личинок содержали в чашках Петри (10 личинок на одну чашку) при температуре 25°C. Через 3 и 4 сут (период колонизации грибом гемоцеля, т.е. появления гифальных тел в гемолимфе) проводился подсчет гифальных тел по методике, описанной О.Г. Томиловой и соавт. (Tomilova et al., 2016). 10 мкл гемолимфы смешивали с 30 мкл стерильного 0,1 М натрий-фосфатного буфера pH 7,2 (PB) содержащего 4 мг / мл фенилтиомочевины. Затем проводили подсчет гифальных тел гриба в гемоцитометре. Для определения содержания грибных токсинов насекомых замораживали при -80°C, затем, лиофилизировали по методике А. Риос-Морено с соавт (Ríos-Moreno et al., 2017).

Экстракция токсинов гриба из зараженных гусениц и их определение методом тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС) проведены совместно с лабораторией Фитотоксикологии и биотехнологии Всероссийского института защиты растений (г. Санкт-Петербург) и НИИ Гигиены, профпатологии и экологии человека (г. Санкт-Петербург). Каждый образец состоял из 3-х лиофилизированных личинок, которых взвешивали, гомогенизировали и обрабатывали 5 мл метанола на возвратной качалке в течение 20 мин, а далее в ультразвуковой ванне в течение 5 мин. Затем экстракт пропускали через шприцевой фильтр с диаметром ячейки 0.2 мкм и высушивали с помощью ротационного испарителя. Для анализа сухой остаток перерастворяли в смеси ацетонитрил–метанол (1:1), встряхивали на вортексе течение 15 мин, затем центрифугировали при скорости вращения ротора 14000 об./мин. Супернатант анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Хроматографическое разделение компонентов экстрактов осуществлялось с использованием хроматографа Dionex Ultimate 3000. на колонке ZorbaxSB-C8 длиной 15 см и внутренним диаметром 4.6 мм, с размером частиц 1,8 мкм. Подвижная фаза включала 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в воде для ВЭЖХ и ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ. Режим элюирования – градиентный с общим временем анализа - 20 мин: 5% ацетонитрила (в течение 1 мин), 5–90% (6 мин), 90% ацетонитрила (8 мин), 5% ацетонитрила (5 мин). Условия хроматографирования были следующими: скорость подачи элюента 0.4 мл/мин, температура термостата колонки 35°C, температура термостата для проб 5°C, объем вводимой пробы 5 мкл.

Определение, метаболитов, характерных по литературным данным для кордицепитациевых грибов, осуществляли на гибридном (квадруполь–орбитальная ионная ловушка) хроматомасс-спектрометре высокого разрешения Q Exactive (Thermo Scientific) с использованием

хроматографической колонки жидкостного хроматографа с последующим детектированием разделенных компонентов детектором, настроенным на регистрацию характеристичных ионов. Способ ионизации электростатическим распылением при атмосферном давлении; режим сканирования 80–1500 m/z в отрицательной и положительной полярности. Режим работы источника ионизации – HESI, поток газа-распылителя – 60 отн. ед., поток вспомогательного газа – 20 отн. ед., напряжение на распылителе – 3 кВ, температура проводящего капилляра – 380°C, температура распылителя – 250°C. Идентификацию веществ проводили по точным масс-фрагментам m/z , соответствующим $[M+H]^+$ и $[M-H]^-$. Ошибка измерения точной массы и элементного состава иона (отличие измеренной массы от расчетной) составляла менее 5 ppm, что позволяет считать проведенную идентификацию достоверной. Не менее шести образцов каждого варианта эксперимента личинок было использовано в анализе.

2.7. Анализ микробных сообществ личинок *G. mellonella* при парализации *H. hebetor* и заражении грибами

В рамках данных экспериментов изучалось влияние яда паразитоидов, инфицирования энтомопатогенными грибами, и совместное действие этих факторов на структуру кишечной микробиоты вошинной огневки.

Для изучения структуры микробиоты был проведен метогеномный анализ среднего кишечника вошинной огневки. Для этого через семьдесят два часа после перкутанного заражения *B. bassiana* (погружение в суспензию 10^6 конидий/мл) и/или парализации личинок поверхностно стерилизовали 70%-ным этанолом и препарировали. Средние кишечника с содержимым извлекали в криобирки и замораживали в жидком азоте (5 средних кишечника на один образец). Для анализа использовались четыре образца каждого варианта. Выделение ДНК и секвенирование проводились в ЦКП

Геномика Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Кратко, ДНК выделяли с помощью набора PowerSoil (Mo Bio). Регионы V3-V4 16S рРНК амплифицировали с помощью праймеров 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') (Fadrosh, et al. 2014). ПЦР проводили в условиях, описанных А. Бручковым с соавт. (Brouchkov et al., 2017). 200 нг ПЦР-продукта каждого образца очищали с помощью MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen). Библиотеки 16S были получены путем секвенирования 2×300 pb на платформе MiSeq (Illumina). Последовательности кластеризовали помощью алгоритма UPARSE (Edgar, 2013) с использованием программы USEARCH v8.1.1861. Алгоритм UPARSE включал фильтрацию качества прочтений, удаление идентичных прочтений, химер и кластеризацию. Последовательности оперативных таксономических единиц (ОТЕ) были разделены с использованием программы SINTAX (Edgar, 2016). Последовательности классифицированные как хлоропласты, были удалены из анализа. Окончательный набор данных содержал 176 ОТЕ (308819 прочтений). Кривые прочтений каждого образца имели тенденцию выхода на плато, что указывало на достаточный объем прочтений (Приложение, Рис. 18). Первичные данные MiSeq были депонированы в GenBank под номером доступа к проекту PRJNA479958 и номером доступа к считыванию последовательностей (SRA) SRP152548.

Для анализа культивируемой микрофлоры среднего кишечника *G. mellonella* средние кишечника препарировали как описано выше. Затем кишечника гомогенизировали в 1 мл 0,1 М фосфатного буфера (один образец = 3 кишечника). Суспензию разбавляли в 10^3 , 10^4 , 10^5 и 10^6 раз. Сто мкл каждого разведения инокулировали на поверхность селективных питательных сред, для *Enterococcus*, *Enterobacter* и *Serratia*, а именно модифицированного желчного эскулинового азид агара (HiMedia, India), эндоагара (HiMedia, India) и дифференциальной среды для *Serratia* (HiMedia, India) соответственно. Чашки Петри инкубировали при 28°C в течение 72ч.

Затем было проведен подсчет колоний на каждой среде. Типичные колонии отбирали и пассировали три раза в тех же условиях для отбора чистых культур. Видовая идентификация культур выполнена В.В. Морозовой (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) и А.В. Кривопаловым (ИСиЭЖ СО РАН) на основе секвенирования региона 16S.

Для того, чтобы установить влияние доминирующих кишечных бактерий на восприимчивость огневки к грибам был проведен ряд биотестов. Трехдневные колонии *Enterococcus*, *Enterobacter* и *Serratia* суспендировали в стерильном 0.1 М фосфатном буфере и разбавляли до 1×10^8 клеток/мл. Суспензии смешивали с кормом для воцинной огневки и помещали в чашки Петри (1 мл суспензии на 3 г корма на одну чашку Петри). В контрольных вариантах корм обрабатывался соответствующим количеством 1 М фосфатного буфера. Личинок четвертого возраста заражали методом погружения в суспензию *B. bassiana* (4×10^6 конидий / мл) в течение 10 с и помещали в чашки Петри (10 личинок на чашку) с обработанным кормом и увлажненными дисками фильтровальной бумаги (800 мкл воды на один диск). Контрольных личинок обрабатывали водно-твинным раствором. Насекомых содержали при постоянной температуре 28°C и относительной влажности 100%. Смертность регистрировали в течение 10 дней. Мумифицированные насекомые были помещены во влажные камеры, для установления причин смерти. Использовали не менее трех повторностей для каждого варианта, а целый эксперимент был повторен независимо три раза.

2.8. Модернизация метода ловушек на основе использования парализованных личинок воцинной огневки

2.8.1. Оценка чувствительности метода

В экспериментах использовали парализованных и не парализованных ядом личинок. Черноземная почва, взятая с распаханного поля в

окрестностях Новосибирска, была стерилизована при 160°C в течение 2 ч. Затем навески почвы (10 г) инокулировали 1 мл суспензии конидий *B. bassiana* с таким расчетом, чтобы были получены концентрации 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 и 5×10^6 конидий/г почвы. Навески почвы гомогенизировали и помещали в чашки Петри (90 мм). В чашки с почвой помещали по 15 парализованных, либо не парализованных гусениц. После этого чашки встряхивали 20 сек, затем добавляли в них 4 мл стерильной воды для создания 100%-ной относительной влажности (RH). Чашки инкубировали при 25°C, 75%-ной RH в темноте без корма. Через 3 сут насекомых извлекали из почвы и перемещали в чистые чашки Петри (90 мм) с дисками стерильной фильтровальной бумаги (80 мм) и инкубировали в указанных выше условиях. Насекомых, мумифицирующихся в течение последующих 12 сут, использовали для посевов грибов. Перед посевами насекомых отмывали от частичек почвы путем 10-секундного встряхивания в водно-твинном растворе при 200 об./мин, затем окунали в 70%-ный этиловый спирт на 2 с, подсушивали и разрезали вдоль тела при помощи лезвия. Стерильной иглой извлекали фрагменты центральной части склероциев грибов и помещали на модифицированную среду Сабуро (агар-агар – 20, декстроза – 10, пептон – 0.25, дрожжевой экстракт – 0.25, молочная кислота – 0.4%). Оставшиеся части мумий раскладывали в чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой. После их обрастания мицелием также осуществляли посев грибов на вышеуказанную среду.

2.8.2. Выделение и идентификация грибов из почвенных образцов

Образцы верхнего слоя почвы (5 см), собранные в разных регионах (от лесотундр до разнотравно-злаковых степей в Европейской части России, Сибири и Прибалхашье), были высушены при 25°C и 25%-ной RH в течение 10 сут, а затем измельчены в ступке до однородной массы. Каждый образец почвы делили на навески по 10 г, которые помещали в чашки Петри (90 мм).

В каждую чашку помещали по 15 не парализованных, либо парализованных ядом гусениц. Дальнейшую инкубацию и посевы проводили по методике, указанной выше (2.8.1). Родовая идентификация грибов проведена с помощью световой микроскопии. Видовая идентификация грибов *Cordyceps* и *Metarhizium* проведена О.Н. Ярославцевой (ИСиЭЖ СО РАН) и Ю.С. Токаревым (ВИЗР).

2.9. Статистическая обработка

Анализ данных проводили с использованием программ STATISTICA v. 8.0 (StatSoft Inc., США), SigmaStat 3.1 (Systat Software Inc., США), PAST (Hammer et al. 2001), AtteStat (Gaidyshev, 2004). Для анализа общего уровня выживаемости использовали тест χ^2 . Различия в динамике смертности анализировались с помощью лог-ранк теста с поправкой Холма-Сидака. Логист-регрессия использовалась для анализа эффективности трансмиссии. Полулетальные концентрации (LC_{50}) определялись методом Спирмена-Карбера (TSK). Данные по физиологическим параметрам проверялись на нормальное распределение с использованием W-теста Шапиро-Уилка. При нормальном распределении данные анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с последующим попарным сравнением с помощью теста Тьюки и, в некоторых случаях, дополнительно, - теста Фишера. При ненормальном распределении использовали непараметрический аналог двухфакторного дисперсионного анализа - тест Шейрера-Рей-Хейра (Scheirer et al., 1976). В данном случае при неравновеликих выборках выравнивание проводили путем рандомизированного исключения переменных в программе Excel. Попарное сравнение при непараметрическом двухфакторном анализе проводили с использованием теста Данна. Влияние кутикулярных экстрактов на прорастание грибов проведено с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) и критерия Тьюки. При анализе смертности

личинок от грибных инфекций при экспозиции в почвах использован дисперсионный анализ без повторений (main effects ANOVA). Синергистический и аддитивный эффекты в смертности насекомых при заражении кишечными бактериями и грибом *B. bassiana* были дифференцированы на основе сравнения ожидаемого и наблюдаемого уровня смертности с использованием критерия χ^2 (Robertson, Preisler, 1992).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Ранее было установлено (Kryukov et al., 2013), что парализация ядом *H. hebetor* приводит к резкому увеличению восприимчивости личинок вощинной огневки к энтомопатогенным грибам с широкой специализацией (*M. robertsii*, *B. bassiana*, *I. farinosa*, *I. fumosorosea*). При этом оставался не ясным вопрос о восприимчивости к грибам с более узкой специализацией, а также к сапротрофным (условно патогенным) грибам. Мы предположили, что узкоспециализированные патогены в меньшей степени зависят от физиологического состояния насекомых, соответственно, вирулентность по отношению к парализованным и не парализованным личинкам у этих грибов будет изменяться незначительно. Напротив, парализованные личинки могут оказаться высоко-восприимчивыми к условно-патогенным грибам.

Для оценки восприимчивости личинок вощинной огневки к грибам с разной специализацией использовали топикальное заражение. Были протестированы конидии сапротрофных аскомицетов *S. brevicaulis*, *A. flavus*, *F. oxysporum*, *Penicillium* sp. Из энтомопатогенных грибов, специализирующихся на чешуекрылых был использован *C. militaris* (аскоспоры). Также были протестированы конидии грибов с ограниченной специализацией, не связанные с чешуекрылыми – *L. muscarium* и *M. raphigum*, поражающие преимущественно тлей и некоторых жесткокрылых (Driver et al., 2000; Brownbridge et al., 2010; Тюрин и др., 2016). Для сравнительного анализа также были протестированы конидии грибов генералисты *B. bassiana* и *M. robertsii*.

При заражении гусениц энтомопатогенными аскомицетами с широкой (*B. bassiana*) и ограниченной специализацией (*C. militaris*) или даже не

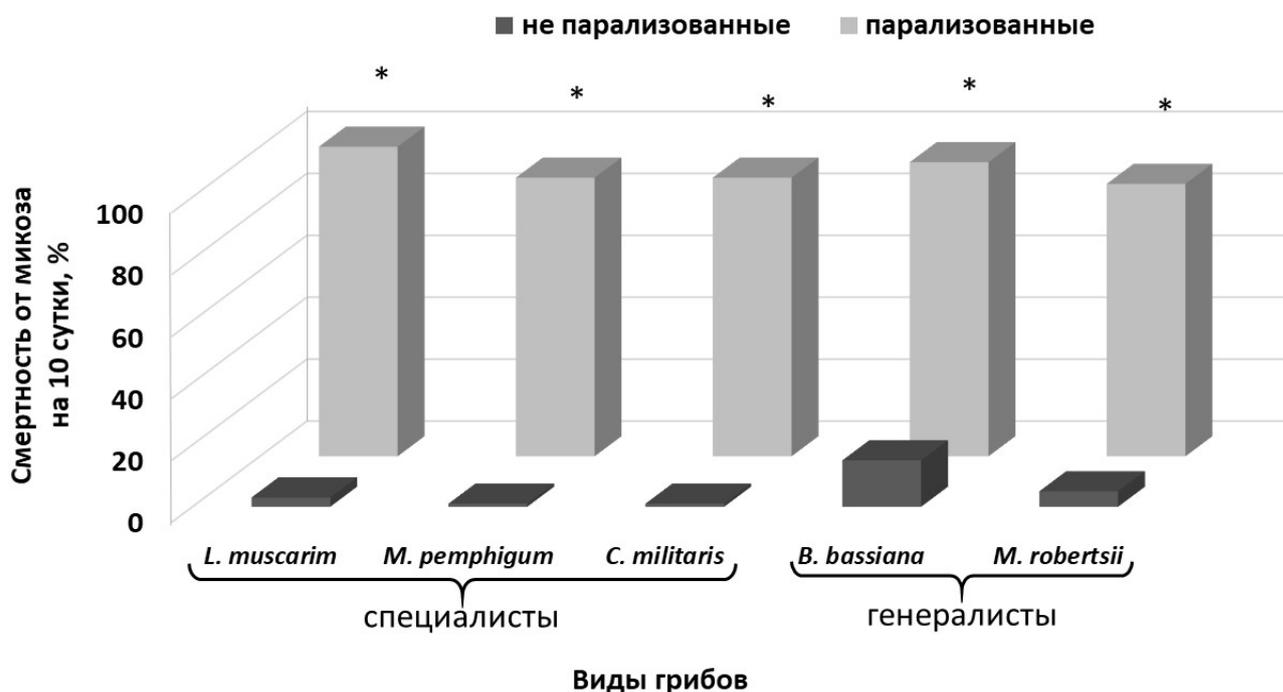


Рисунок 3. Смертность личинок *G. mellonella* при топикальном заражении грибами с разной специализацией. Дозы инфекции - 10^5 конидий на личинку; для *C. militaris* - 10^5 аскоспор на личинку. * - существенные различия между парализованными и не парализованными личинками при инфицировании определенным видом гриба ($\chi^2 > 4.5$, $P < 0.05$).

специфическими для вошинной огневки патогенами (*L. muscarium*, *M. pemphigum*) парализация приводила к резкому усилению восприимчивости к микозам (Рис. 3). В частности, у не парализованных личинок развития микозов *C. militaris*, *L. muscarium* и *M. pemphigum* не наблюдали, тогда, как парализованные ядом личинки поражались этими грибами в 90-100% случаев ($\chi^2 > 4.5$, $P < 0.05$).

Таким образом, восприимчивость к данным патогенам при парализации возрастала не менее чем на один порядок. При инфицировании указанными видами наблюдалось «классическое» развитие микозов с формированием склероциев внутри погибших насекомых и последующим поверхностным конидиеобразованием. В ряде тестов (при заражении *L. muscarium*,

C. militaris и *M. robertsii*) одновременно с мумификацией наблюдался поверхностный рост гриба на кутикуле (Приложение, Рис. 19), что говорит об определенных модификациях в развитии гриба на парализованных насекомых.

При заражении не парализованных личинок вощинной огневки сапротрофными грибами *S. brevicaulis*, *F. oxysporum*, *A. flavus* и *Penicillium* sp. (10^5 конидий на личинку) развития микозов не регистрировалось, а при инокуляции данными грибами парализованных гусениц отмечался лишь поверхностный рост мицелия на кутикуле (*S. brevicaulis* и *F. oxysporum*, Приложение, Рис. 20), но мумификации насекомых не происходило. Т.е. в отличие от энтомопатогенных грибов, сапротрофы не были способны преодолевать кутикулу и проникать в гемоцель парализованных личинок.

Таким образом, иммуносупрессия насекомых ядом *H. hebetor* способствует ослаблению резистентности личинок вощинной огневки не только к грибам - генералистам, но также к грибам с ограниченной специализацией. Причем данная восприимчивость возрастает как к специалистам, развивающимся на чешукерылых (*C. militaris*), так и на других отрядах насекомых (*L. muscarium*, *M. pemphigum*). Это свидетельствует о необходимости физиологического ослабления насекомых для успешного развития не только энтомопатогенных грибов – генералистов (как предлагает Ж. Бумсма с соавт. (Boomsma et al., 2014), но и более специализированных видов. Результаты согласуются с недавним исследованием (Крыуков et al., 2018b), в котором показано, что развитие гриба с ограниченной специализацией *C. militaris* более успешно протекает на диапаузирующих насекомых, характеризующихся пониженным уровнем клеточного и гуморального иммунитета. Важно отметить, что сапротрофные грибы не были способны колонизировать гемоцель парализованных личинок огневки. Вероятно уровень иммунитета парализованных ядом личинок сохраняется на достаточном уровне для того чтобы противостоять сапротрофным грибам.

Следует отметить, что повышенная восприимчивость насекомых к энтомопатогенным грибам под влиянием различных эндопаразитов (Braconidae, Ichneumonidae), ядов (или компонентов ядов) показана в ряде работ (King & Bell, 1978; El-Sufy & Führer, 1981a, b, 1985; Dani et al., 2004; Dos Santos et al., 2006; Richards et al., 2011). В исследуемой нами модели (*G. mellonella* – *H. hebetor* – *B. bassiana*) регистрировалось более значительное увеличение восприимчивости к грибам. Интересно отметить, что энтомопатогенные нематоды *Heterorhabditis* более активно заражали личинок *Plodia interpunctella* Hübner, парализованных *H. hebetor*, по сравнению со здоровыми (не парализованными) личинками (Mbata & Shapiro-Ilan, 2010). Причины данных изменений в восприимчивости недостаточно изучены и будут рассмотрены нами в разделах 3.3-3.5.

Резюмируя вышесказанное, отметим, что иммуносупрессия насекомых ядом *H. hebetor* способствует снижению резистентности именно к энтомопатогенным грибам, в том числе неспецифическим для хозяев.

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

Ранее было отмечено, что инокуляция самок паразитоида энтомопатогенным грибом *B. bassiana* и последующая атака личинок вошинной огневки приводит к гибели личинок огневки от микоза (Крюков, и др. 2015; Kryukov et al., 2018a). В тоже время оставалось не известным, могут ли паразитоиды осуществлять перенос инфекции от зараженных личинок к здоровым, какова может быть эффективность данного переноса, необходимо ли введение конидий грибов в гемоцель яйцекладом паразитоида или достаточно поверхностного контакта между паразитоидом и хозяином.

В первом эксперименте мы использовали подсадку паразитоидов к гусеницам вошинной огневки, перкутанно зараженным конидиями *B. bassiana* (6 часов после инокуляции, стадия адгезии). После парализации паразитоидами данных гусениц, паразитоидов пересаживали к группам, состоящим из 10 личинок вошинной огневки. При этом оценивали: 1) способность к *H. hebetor* парализации; 2) процент случаев успешного переноса (успешным переносом считали те случаи, когда хотя бы одна личинка из 10 реципиентов погибала от микоза); 3) количество личинок – реципиентов, погибших от микоза.

После контакта *H. hebetor* с не инфицированными (контрольными) личинками самки паразитоиды были способны парализовать в среднем 8.5 ± 0.9 личинок огневки. После контакта *H. hebetor* с личинками огневки, инфицированными конидиями (концентрации 10^6 , 10^7 и 10^8 конидий/мл) каждая самка паразитоида была способна парализовать 9.7 ± 0.1 , 8 ± 0.9 и 8.4 ± 0.7 личинок соответственно. То есть контакт самки с зараженным грибом хозяином не оказывал существенного влияния на ее способность к последующей парализации личинок в течение первых суток.

Успешный перенос грибов от инфицированных личинок к здоровым через самок паразитоида происходил в 78%, 89%, 92% случаев после

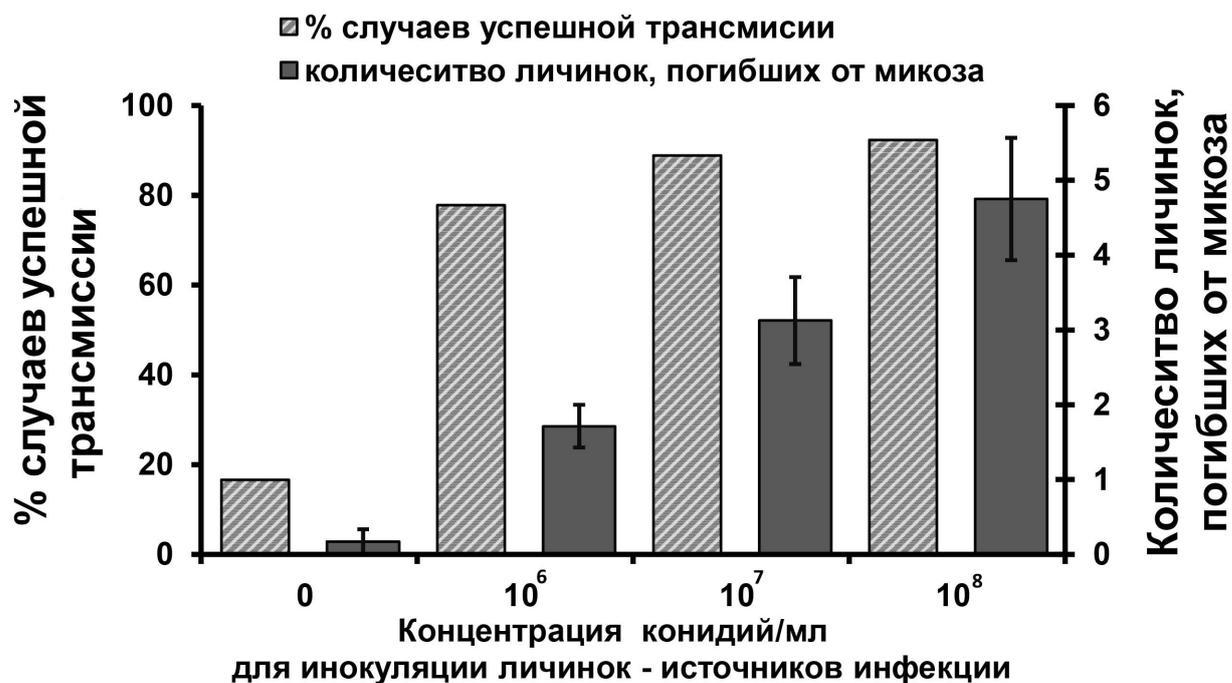


Рисунок. 4 Эффективность переноса конидий *B. bassiana* от инфицированных к нативным личинкам *G. mellonella* самками паразитоида. Показан процент успешных случаев переноса *B. bassiana* паразитоидами и среднее число личинок *G. mellonella*, погибших от микоза (7, 9, 9, 13 повторностей для концентраций 0, 10⁶, 10⁷ и 10⁸ соответственно). Вертикальные линии показывают ошибки средних арифметических.

контакта самки с личинкой огневки, зараженной 10⁶, 10⁷ и 10⁸ конидий/мл, соответственно (логит регрессия: $\chi^2 = 12.8$; $df = 1$; $P = 0.005$, Рис. 4). После контакта с инфицированными грибом личинками каждая самка паразитоида была способна к переносу и успешному заражению от 1 до 9 здоровых личинок (Рис. 4), что зависело от дозы, которыми были инфицированы личинки - источники инфекции (корреляция Спирмена: $r = 0.52$; $P = 0.005$; $n = 27$).

В следующем эксперименте самок паразитоидов подсаживали к группам гусениц, среди которых 40% были инфицированы разными концентрациями конидий *B. bassiana* (стадия адгезии), а 60% – не были заражены. Для сопоставления были использованы группы с аналогичным

соотношением зараженных и не зараженных особей, но без подсадки паразитоидов. Наблюдали существенное повышение смертности от микозов в группах огневки, где присутствовали паразитоиды (двухфакторный дисперсионный анализ, эффект парализации: $F_{1.54} = 155.8$, $P < 0.00001$, Рис. 5). В частности, присутствие личинок бракона увеличивало уровень смертности от микоза в 1.5, 2.5 и 13.0 раз при концентрациях 10^8 , 10^7 и 10^6 конидий/мл соответственно (попарное сравнение Тьюки: $P < 0.0005$). Во всех группах с присутствием паразитоидов смертность была выше ожидаемого 40%-го уровня ($\chi^2 > 15$, $df = 1$: $P < 0.0001$). Следует отметить, что при отсутствии паразитоидов и инокуляции высоким титром (10^8 конидий/мл) уровень гибели от микоза был выше ожидаемого: 63% против 40% ($\chi^2 = 14.7$, $df = 1$, $P = 0.0001$). Этот феномен показывает то, что при высоких инфекционных нагрузках не только паразитоид повышал уровень трансмиссии конидий, но и прямая передача конидии между зараженными и здоровыми гусеницами имела место.

Для того чтоб понять механизмы передачи конидий грибов паразитоидами, мы поставили ряд тестов, целью которых было выяснить необходимо ли введение конидий в гемоцель хозяина самкой *H. hebetor*, или достаточно переноса конидий на поверхность кутикулы хозяина. Для этого мы использовали как самок, так и самцов *H. hebetor*. Самцов инокулировали грибной суспензией (10^5 конидий / мл) и подсаживали к личинкам огневки, заранее парализованных нативными самками паразитоида. Для сравнения использовали аналогичный тест но, с использованием самок паразитоида, зараженных той же концентрацией. Парализация личинок *G. mellonella* самками паразитоида, зараженными конидиями *B. bassiana*, приводила к 87% смертности от микоза. В тоже время при содержании парализованных личинок воцинной огневки с инокулированными грибами самцами паразитоида наблюдалось незначительное снижение смертности (80%)

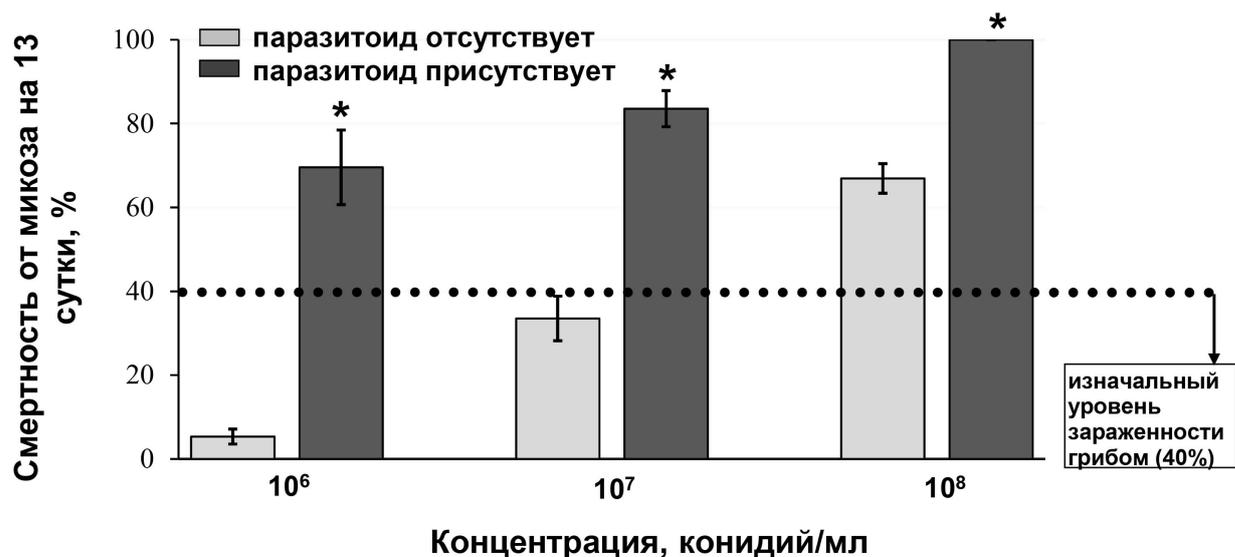


Рисунок. 5. Влияние самок паразитоида *H. hebetor* на уровень смертности от микозов в группах *G. mellonella*, где 40% личинок было заражено грибом *B. bassiana* в разных концентрациях. Вертикальные линии показывают ошибки средней арифметической для 10 повторностей. * - существенные различия (тест Тьюки: $P < 0.05$) для определенной концентрации. Смертность в контролях (группах, не содержащих зараженных грибом насекомых) не регистрировалась.

($\chi^2 = 0.96$, $df = 1$, $P = 0.34$). Уровень спонтанной грибной инфекции в не зараженных, но парализованных контрольных группах не превышал 8%. Таким образом, поверхностного контакта было достаточно для передачи гриба, и инъекция конидий яйцекладом была не обязательна.

Полученный результат с контаминацией самцов привел к следующему вопросу: обязателен ли вообще контакт паразитоида и хозяина для передачи конидий или достаточно контаминация субстрата (в наших экспериментах чашек Петри)? Для того чтобы показать возможна ли передача инфекции через контаминацию чашек Петри самок паразитоида *H. hebetor*, зараженных суспензией *B. bassiana* (1×10^7 конидий/мл), содержали в чашках Петри в течение 6 часов, после чего их удаляли. Последующее размещение в

контаминированной чашке интактных личинок восковой моли и не зараженных самок паразитоида приводило к 58% смертности личинок от микоза. Однако, при прямом контакте личинок вощинной огневки с инокулированными самками паразитоида смертность от микоза была значительно выше и составляла 92% ($\chi^2 = 16.9$, $df = 1$, $P < 0.001$). Таким образом, прямой контакт существенно увеличивал эффективность трансмиссии конидий грибов.

Результаты проведенных экспериментов указывают на то, что паразитоид не только увеличивает восприимчивость личинок вощинной огневки к микозам, но и переносит конидии между ними. Значительное увеличение восприимчивости огневки к энтомопатогенным грибам приводит к весьма высокому уровню смертности при переносе минимальных доз грибов. Самка паразитоида способна передать инфекцию нескольким особям хозяина. Инъекция конидий в гемоцель яйцекладом не является обязательной, и поверхностного контакта паразитоида и насекомого хозяина может быть вполне достаточно для заражения и развития микоза. Кроме того, источником инфекции могут служить поверхности контаминированные конидиями грибов, переносимых паразитоидом.

Наши результаты демонстрируют возможность того, что паразитоид *H. hebetor* может переносить *B. bassiana* в лабораторных условиях, благоприятных для развития микозов. Однако, неизвестно, могут ли эктопаразитоиды способствовать горизонтальной передаче энтомопатогенных грибов в природе. Также, эти ситуации могут быть актуальны при совместном применении энтомопатогенных грибов и *H. hebetor* в качестве агентов биологического контроля. Мы предполагаем, что сильное подавление иммунных реакции хозяина может обеспечить успешный перенос грибов и минимизировать количество инокулюма для успешной инфекции. Вероятно, эктопаразитоиды могут участвовать в передаче энтомопатогенных грибов среди насекомых, обитающих в

различных «убежищах» (например, укрытиях, сооружаемых ими из растений), а также и распространять грибные инфекции при низкой плотности хозяев. Следует отметить, что горизонтальный перенос гриба самками *H. hebetor*, помимо вощинной огневки, регистрировался нами у крестовниковой медведицы *Tyria jacobaeae* Linnaeus и черемуховой горностаевой моли *Yponomeuta evonymella* Linnaeus в лабораторных экспериментах (см. Приложение, табл. 2).

До наших исследований возможность горизонтального переноса грибов паразитоидами показана в работе М. Оресте с соавт. (Oreste et al., 2016) на модели тепличная белокрылка *Trialeurodes vaporariorum* Westwood эндопаразитом – *E. formosa* – энтомопатогенный гриб *B. bassiana*. Авторы отмечали более низкий уровень переноса гриба паразитоидом. В частности, смертность белокрылок от микоза, по данным этих авторов, не превышала 26%.

Известно, что паразитоиды могут избегать как насекомых, зараженных энтомопатогенными грибами, так и мест обитания с высокой плотностью энтомопатогенных грибов (Reannbeack et al., 2015; Cotes et al., 2015). Однако, как правило, паразитоиды способны распознавать инфицированных хозяев лишь на поздних стадиях заболеваний, но не на начальных (Furlong & Pell, 2000; Baverstock et al., 2010). Ранее было показано, что в тестах с лабиринтом самки *H. hebetor* не могли различить личинок, зараженных и не зараженных грибом *B. bassiana* (стадия адгезии) (Kryukov et al., 2018a). Интересно, что самки *H. hebetor* также не распознавали личинок *P. interpunctella*, зараженных нематодами *Heterorhabditis* (Mbata & Shapiro-Ilan, 2010). Наши эксперименты по уровню гибели от микоза в группах огневки, включающих определенный процент зараженных личинок, также демонстрируют не существенность фактора выбора паразитоидом зараженных или не зараженных грибом особей.

Таким образом, мы показали высокую эффективность горизонтального переноса энтомопатогенного гриба *B. bassiana* паразитоидом *H. hebetor* среди личинок вощинной огневки в лабораторных условиях. Важным результатом является то, что для осуществления переноса достаточно поверхностной (кутикулярной) контаминации хозяина энтомопатогенным грибом. Соответственно, эффективность переноса обусловлена резким падением защитных систем, связанных, по-видимому, в первую очередь с кутикулой хозяев. Данные механизмы мы рассмотрим более подробно в следующей главе.

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

В предыдущих главах мы показали резкое усиление восприимчивости насекомых к различным энтомопатогенным грибам после парализации ядом *H. hebetor*. Причины такого усиления не достаточно изучены. Н.А. Крюковой (Kryukova et al., 2011, 2015) показано двукратное падение уровня фенолоксидаз и инкапсуляции в гемолимфе парализованных гусениц огневки. Данные параметры иммунитета тесно связаны с устойчивостью к грибным инфекциям (Hajek, St Leger, 1994; Butt et al., 2016). Резкое падение инкапсуляции у *S. littoralis* при парализации близким видом *H. nigricans* показано также А. Бекчиманзи с соавт. (Vecchimanzi et al., 2017). Однако, изменения, связанные с прорастанием конидий гриба на кутикуле (Kryukov et al., 2018a), а также модификации в поведении грибов на поверхности парализованных гусениц (см. раздел 3.1.) свидетельствует о существенных изменениях кутикулы после парализации. Кроме того, иммунный ответ у парализованных личинок вощинной огневки при заражении энтомопатогенными грибами не изучался. Ниже мы рассмотрим влияние эпикуткулярных экстрактов на прорастание грибов, а также совместный эффект парализации и микоза на основные защитные реакции иммунитета личинок вощинной огнёвки.

3.3.1. Влияние эпикуткулярных экстрактов личинок огневки на прорастание грибов

Для прикрепления и прорастания конидий грибов наиболее значимым является химический состав поверхностного слоя покровов – эпикуткулы. Данный слой включает такие соединения как свободные и связанные жирные кислоты, углеводороды и другие вещества, композиционный состав которых влияет на устойчивость к энтомопатогенным грибам (Jarrold et al., 2007; Golebiowski et al., 2008; Ment et al., 2010, 2013). Мы предположили, что при

парализации происходят изменения в содержании углеводов и жирных кислот, что оказывает влияние на активацию конидий грибов.

В данной работе мы проводили последовательный смыв с эпикутикулы парализованных и не парализованных личинок *n*-гексаном и дихлорметаном. Далее мы оценивали прорастание конидий *B. bassiana* в данных экстрактах, нанесенных на поверхность 2%-й агарозы. В работе С. Джаролдда и соавторов (Jarrold et al., 2007) показано, что с помощью *n*-гексана извлекается преимущественно неполярная фракция эпикутикулы (углеводороды). После обработки *n*-гексаном остатки неполярной фракции, а также полярная фракция (жирные кислоты) извлекаются с помощью дихлорметана (Ment et al., 2010).

Нами обнаружена стимуляция прорастания конидий при их экспозиции на обеих фракциях (*n*-гексановой и дихлорметановой), по сравнению с контролем (обработкой агарозы чистыми растворителями) (Рис. 6). При этом регистрировалось значительное повышение прорастания конидий гриба на смыве *n*-гексаном у парализованных гусениц, по сравнению с не парализованными (в 1.83 раза, тест Тьюки: $P < 0.05$). Прорастание конидий на смывах кутикулы парализованных и не парализованных личинок, выполненных дихлорметаном существенно не различалось ($P > 0.05$).

Далее в смыве, выполненном *n*-гексаном, были проведены идентификация и определение содержания основных компонентов эпикутикулярного слоя нативных и парализованных личинок с помощью хроматографического анализа (ГХ-МС). Среди мажорных компонентов были детектированы миристиновая (C14:0), пальмитоолеиновая (C16:1), пальмитиновая (C16:0), линолевая (C18:2), олеиновая (C18:1), линолевая (C18:3) и стеариновая (C18:0) кислоты, а также углеводороды – *n*-пентакозан (C25), *n*-гептакозан (C27), *n*-нонакозан (C29) и *n*-гентриаконтан (C31) (Рис. 7). Из жирных кислот эпикутикулы достоверные отличия в снижении

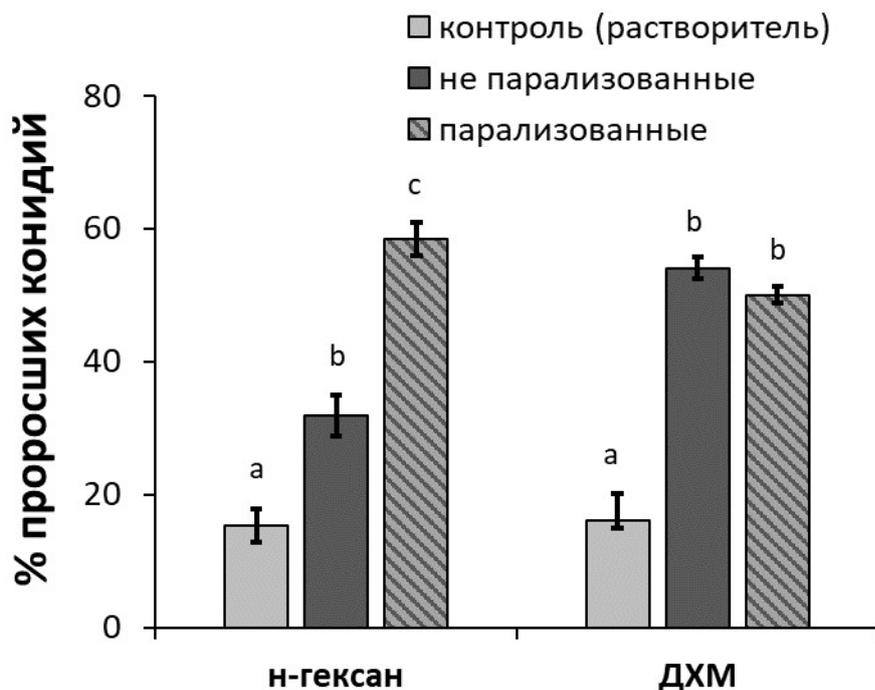


Рисунок 6. Прорастание конидий гриба *B. bassiana* через 24 часа после инкубации на агарозе, обработанной экстрактами эпикутикулы личинок вощинной огневки. Экстракты получены путем последовательного смыва н-гексаном и, затем, дихлорметаном (ДХМ). В качестве контролей использовали растворители, нанесенные на поверхность агарозы. Вертикальные линии показывают ошибки средних арифметических. Одинаковыми буквами указаны недостоверные различия внутри каждого типа экстракта (тест Тьюки, $P > 0.05$).

отмечены для миристиновой (C14:0) и линолевой (C18:2) кислот у парализованных личинок, по сравнению с нативными ($P < 0.05$). В целом парализация личинок огневки браконом приводила к снижению содержания свободных жирных кислот эпикутикулы на уровне тенденции ($P = 0.11$). Кроме того, фактор парализации приводил к снижению содержания углеводов ($F_{1,16} = 8.4$, $P = 0.01$). В частности достоверные различия ($P < 0.05$) отмечены для н-пентакозана (C25) и н-гептакозана (C27).

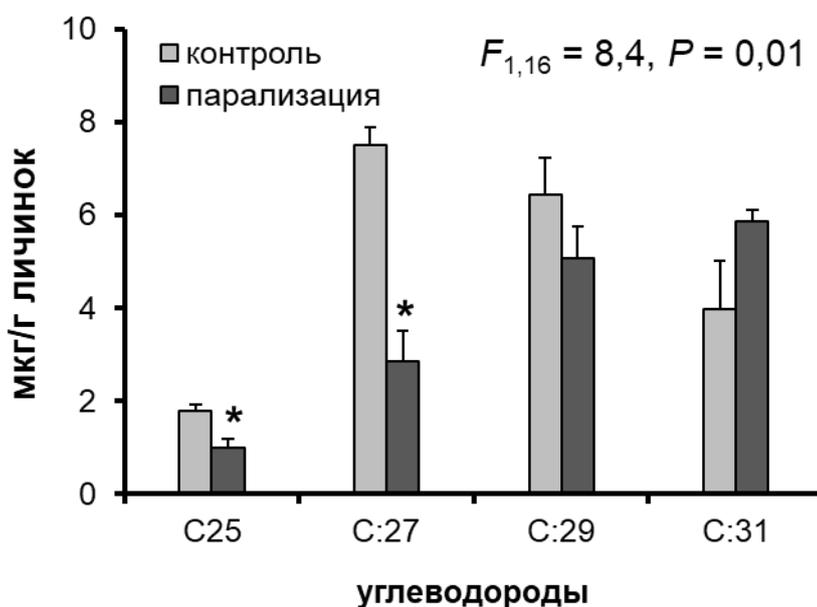
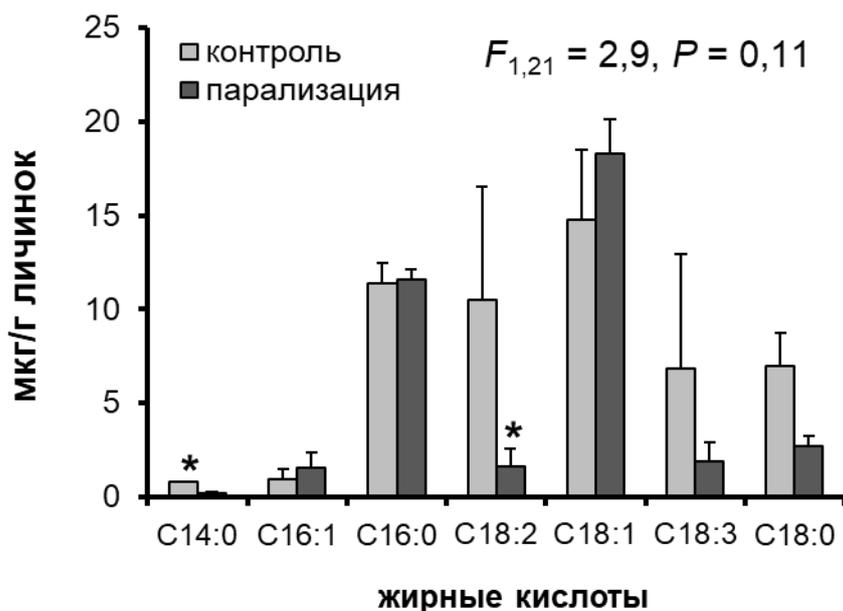


Рисунок 7. Содержание жирных кислот и углеводов в экстрактах эпикутикулы нативных и парализованных ядом *H. hebetor* личинок вощинной огневки (2 сут после введения яда). В качестве экстрагента использован 98% н-гексан. Вверху указаны значения двухфакторного дисперсионного анализа, по фактору «парализация», * - достоверные различия между парализованными и нативными личинками ($P < 0.05$).

Таким образом, мы показали, что в эпикутикулярном смыве н-гексаном присутствуют как неполярные соединения (углеводороды) так и полярные

вещества (жирные кислоты). По всей видимости, снижение количества жирных кислот и углеводов при парализации ядом бракона связано с остановкой развития и общим снижением метаболизма насекомых.

Ранее было показано, что количество жирных кислот в эпикутикуле повышается в процессе роста гусениц вощинной огневки (Golebiowski et al., 2008). Вероятно, активация конидий на эпикутикуле парализованных гусениц связана с более низким содержанием жирных кислот. Известно, что жирные кислоты (C16–C18) ингибируют прорастание энтомопатогенных грибов (Ment et al., 2013; Butt et al., 2016; Kryukov et al., 2018d), что согласуется с более активным ростом гриба на кутикуле (или ее гексановом экстракте) у парализованных гусениц. Что касается углеводов, данные соединения являются важнейшим источником питания для энтомопатогенных грибов *Metarhizium* и *Beauveria*. Данные соединения играют существенную роль в грибных патогенезах, определяя способность гриба к адгезии, прорастанию и проникновению через кутикулу (Pedrini et al., 2007; Lin et al., 2011; Huarte-Bonnet et al., 2017). Возможно, модификации в поведении энтомопатогенных грибов на кутикуле парализованных насекомых обусловлены количественными изменениями углеводов. Однако данный вопрос требует дальнейших исследований.

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

Во многих работах показано, что насекомые, характеризующиеся высокой активностью фенолоксидаз (ФО) в кутикуле и повышенным уровнем меланизации покровов оказываются более резистентными к грибным инфекциям. В частности, М. Ашида и П. Брей (Ashida & Brey, 1998), К. Уилсон и соавт. (Wilson et al., 2001), И.М. Дубовский и соавторы (Dubovskiy et al., 2013b) показали позитивную корреляцию между уровнем

ФО и устойчивостью насекомых к энтомопатогенным грибам *Beauveria*, *Metarhizium* и др. При развитии микозов, как правило, происходит повышение активности ФО в кутикуле насекомых, в том числе, у вошинной огневки (Dubovskiy et al., 2013b). При этом влияние парализации ядом паразитоидов на уровень кутикулярной ФО хозяев не изучался.

Инкапсуляция – важнейший механизм защиты от пропагул гриба, проникающих в гемоцель насекомых (Hajek, St Leger, 1994; Wang, St Leger, 2006; Wang et al., 2012; Butt et al., 2016). Инкапсуляция может повышаться или снижаться при развитии микозов, что зависит от стадии развития грибного заболевания, вида и штамма энтомопатогенного гриба, уровня его вирулентности (Wang et al., 2012; Dubovskiy et al. 2013a; Butt et al., 2016). Повышенный уровень инкапсуляции свидетельствует об активном сопротивлении грибной инфекции, пониженный – о критическом состоянии насекомого во время микоза и возможной скорой гибели. Как отмечалось выше, у насекомых, парализованных ядом *Habrobracon*, происходит падение уровня инкапсуляции (Kryukova et al., 2011; Vecchimanzi et al., 2017). Однако каким образом парализованные насекомые отвечают на грибное вторжение, остается неизвестным.

В данной серии экспериментов мы заражали парализованных и не парализованных личинок огневки перкутанно. Использовали гриб *B. bassiana* в концентрации 1×10^6 конидий/мл, приводящей к 95%-й гибели парализованных личинок и лишь 20%-й гибели не парализованных личинок. Через 24 и 48 часов после заражения мы оценивали уровень фенолоксидаз в кутикуле личинок и уровень инкапсуляции нейлонового имплантата.

Парализация приводила к значительному повышению уровня фенолоксидаз в кутикуле личинок огневки (двухфакторный дисперсионный анализ,

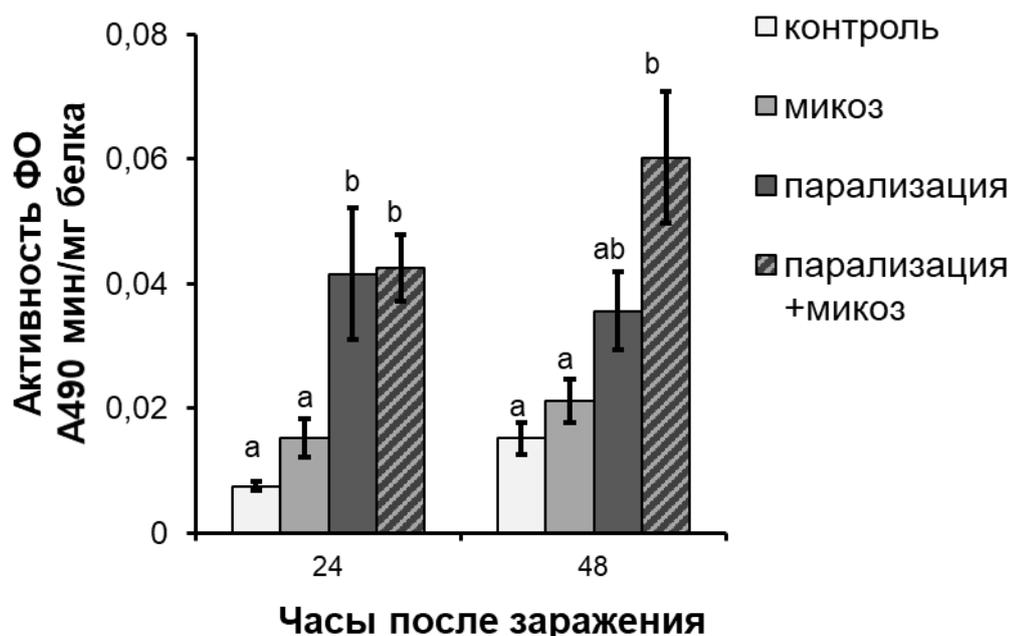


Рисунок 8. Активность фенолоксидаз в кутикуле личинок вощинной огневки при заражении энтомопатогенным грибом *B. bassiana* и парализации ядом паразитоида *H. hebetor*. Вертикальные линии показывают ошибки средних арифметических. Одинаковыми буквами указаны недостоверные различия внутри одной временной точки (тест Тьюки, $P > 0.05$).

эффект парализации: $F_{1,32} > 18.8$, $P < 0.0005$, Рис. 8). Кроме того, повышенная активность фенолоксидаз наблюдалась через 48 часов после заражения грибом (эффект грибной инфекции: $F_{1,32} = 5.0$, $P = 0.032$). Важно отметить, что через 48 часов парализованные личинки реагировали на грибную инфекцию 1.5-кратным подъемом фенолоксидаз на уровне отчетливой тенденции (тест Тьюки: $P = 0.07$; тест Фишера: $P = 0.05$).

Парализация личинок огневки ядом приводила к значительному снижению уровня инкапсуляции (эффекты парализации: $F_{1,173} > 21.8$, $P < 0.0001$ для 24 ч; $F_{1,166} = 220.3$, $P < 0.0001$ для 48 ч; Рис. 9). Грибная инфекция также существенно ингибировала процесс инкапсуляции, но только через

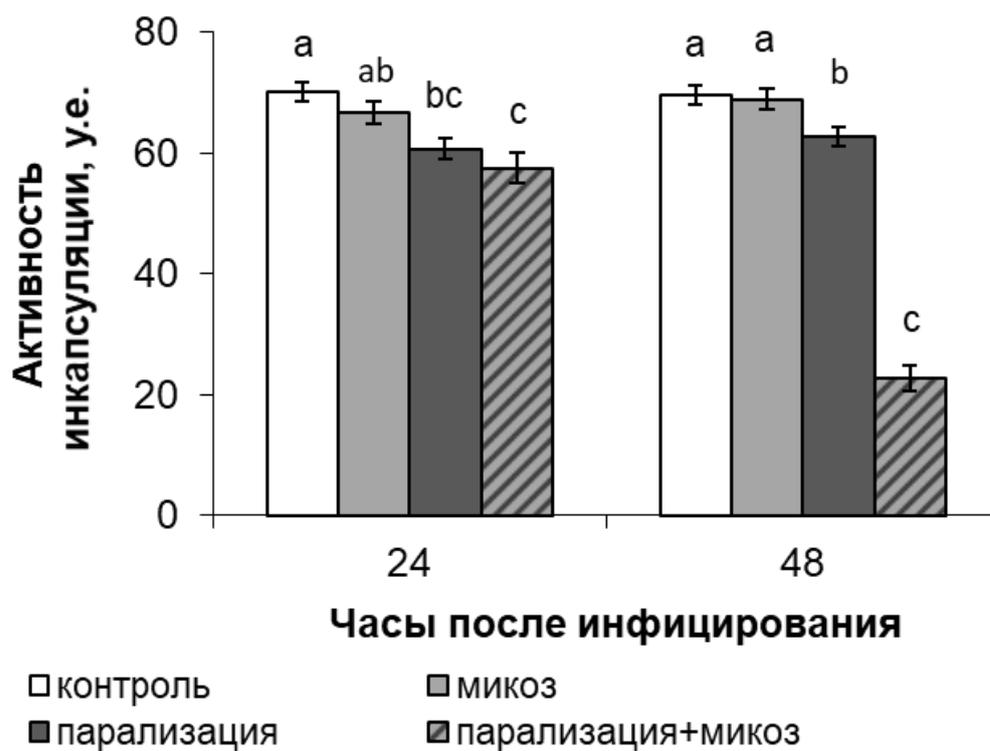


Рисунок 9. Активность инкапсуляции у личинок вощинной огневки при парализации *H. hebetor* и заражении грибом *B. bassiana*. Вертикальные линии показывают ошибку средней арифметической. Одинаковыми буквами указаны недостоверные различия внутри одной временной точки (тест Тьюки, $P > 0.05$).

48 ч после инфицирования (эффект микоза: $F_{1.166} = 129.0$, $P < 0.0001$). Наиболее резкое снижение уровня инкапсуляции (более чем в 2.7 раза по сравнению с остальными вариантами эксперимента) было установлено для парализованных и зараженных грибом личинок через 48 часов после инфицирования. В данной временной точке эксперимента было выявлено существенное взаимодействие факторов микоз \times парализация ($F_{1.166} = 120.4$, $P < 0.0001$).

Таким образом, яд паразитоида ингибировал уровень инкапсуляции, но приводил к повышению активности ФО в кутикуле. Причины активации ФО

в кутикуле при парализации паразитоидом недостаточно ясны. Мы можем только предполагать, что данный подъем связан с проколами кутикулы яйцекладом паразитоида или воздействием яда паразитоида на клетки эпидермиса. Также возможно, что повышение ФО в кутикуле хозяина является одной из адаптации паразитоида для предотвращения вторичных инфекций. В настоящем исследовании повышенная активность ФО в покровах не была способна предотвратить развитие микоза у парализованных личинок. Парализованные личинки реагировали на грибную инфекцию активацией ФО. Однако эта активация могла быть лишь симптомом, связанным с проникновением гриба через кутикулу. Так, повышенный уровень ФО в покровах личинок вощинной огневки регистрировался при развитии микозов, приводящих к 80-100% смертности (Dubovskiy et al., 2013b). Также нами установлено, что при развитии микозов у личинок колорадского жука уровень ФО в кутикуле позитивно коррелирует с уровнем смертности насекомых (Тюрин и др., 2016). Несущественный вклад меланизации и/или ФО активности в устойчивость саранчовых и чешуекрылых к энтомопатогенным грибам отмечался С.К. Уилсоном (Wilson et al., 2001). М.В. Левченко с соавт. (Левченко и др., 2007) показали, что темная (стадная) форма перелетной саранчи *Locusta migratoria* Linnaeus более восприимчива к аскомицетам *Beauveria* и *Metarhizium* по сравнению с более светлой (не стадной) формой.

Результаты по подавлению инкапсуляции под действием яда *H. hebetor* согласуются с ранее полученными данными (Круикова et al., 2011). Однако, наибольшее падение уровня данного показателя регистрировалось при совместном действии яда и грибной инфекции, что свидетельствует об активно развивающемся микозе у парализованных гусениц. Ранее нами показано, что под действием энтомопатогенных грибов (*Beauveria*, *Metarhizium*) и различных природных и полусинтетических иммуносупрессоров, наибольшее падение уровня инкапсуляции наблюдается

именно при комбинированном действии грибов и токсикантов (Kryukov et al., 2018d; Крюков и др. 2015; Yaroslavtseva et al., 2017).

Подводя итоги данной главы, отметим, что снижение устойчивости к грибным патогенам у личинок, парализованных ядом *H. hebetor*, по всей видимости, 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. Однако, данное повышение не способно остановить развитие грибной инфекции. Это свидетельствует о комплексности феномена повышения восприимчивости к грибам у насекомых хозяев. Для резкого ослабления резистентности необходимо ингибирование не одной конкретной защитной реакции, а общее физиологическое ослабление хозяина, сопряженное с подавлением комплекса защитных механизмов. В данной работе не проводился анализ экспрессии генов антимикробных пептидов (АМП), которые могут существенно влиять на развитие микозов (Mukherjee, Vilcinskas, 2018). Будущие исследования будут направлены на анализ АМП воцинной огневки при парализации и грибных инфекциях.

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

Одной из важнейших характеристик развития микозов является динамика накопления гифальных тел грибов в организме хозяев (Sandhu 2012). Изменения в скорости колонизации гемолимфы гифальными телами гриба может быть тесно связаны с физиологическим состоянием насекомого. Как правило, у насекомых с подавленным иммунитетом данное накопление происходит быстрее (Tomilova et al., 2016). С колонизацией гемоцеля грибом связано накопление токсинов патогена, выполняющих иммуномодуляторные функции (Ríos-Moreno et al., 2017). Следует отметить, что вопрос о накоплении грибных токсинов в хозяине исследовался только для сравнения штаммов с разным уровнем вирулентности (Ríos-Moreno et al., 2017). Однако уровень токсинов грибов в хозяевах с разным физиологическим состоянием не изучался.

В данном разделе мы исследовали накопление токсина гриба *C. militaris* кордицепина (3'-дезоксиаденозина), а также других метаболитов этого аскомицета в парализованных и не парализованных личинках. Известно, что кордицепин подавляет синтез нуклеиновых кислот и обладает цитотоксическими, тератогенными и инсектицидными свойствами (Roberts, 1981; Kim et al., 2002; Hollyday, Cleaver, 2008). Выбор в данной модели гриба *C. militaris* был связан с тем, что кордицепин способен весьма длительно сохраняться в различных субстратах, тогда как многие другие грибные токсины (например, деструксины) подвержены достаточно быстрому распаду (Ríos-Moreno et al., 2016), и их содержание может снижаться в процессе пробоподготовки, хранения и перевозки материала. Для заражения насекомых в данной модели использовали инъекцию бластоспор в гемоцель для нивелирования влияния кутикулярной защиты и выравнивания стартовых условий патогенеза. Мы предположили, что накопление

гифальных тел будет быстрее проходить в парализованных личинках, поскольку они характеризуются сниженным клеточным иммунитетом. В тоже время уровень кордицепина в парализованных личинках, вероятно, будет более низким, поскольку грибу не придется преодолевать защитные системы хозяев, такие как инкапсуляция.

После инъекции насекомых бластоспорами *C. militaris* (10 тыс. бластоспор на личинку) не было отмечено различий во времени мумификации между парализованными и не парализованными личинками. Гибель и мумификация личинок обеих групп регистрировалась на 5-6-е сутки после инъекции. В контрольном варианте (инъекция физиологическим раствором) гибели личинок не регистрировалось. Число гифальных тел в зараженных *C. militaris* гусеницах при микозе увеличивалось со временем (Рис. 10). Интересно, что в парализованных гусеницах регистрировалось меньшее количество гифальных тел в гемолимфе по сравнению с не парализованными, однако, из-за значительного варьирования, различия были только на уровне тенденции (двухфакторный дисперсионный анализ, эффект парализации: $F_{1,19} = 1.9$, $P = 0.18$).

В инфицированных грибом гусеницах (как парализованных так и не парализованных) были детектированы кордицепин и кордицепиамиды А, В, С и D (Рис. 11). В контрольных (не зараженных) гусеницах данные соединения не обнаружены. Содержание, кордицепина в инфицированных гусеницах составляло в среднем от 244 ± 41 нг/на 100 мг сухой массы гусениц или 52 ± 9 нг на одну личинку. При этом отмечено значительное варьирование (абсолютные мин. и макс.: 4 – 650 на 100 мг сухой массы). Концентрация данного метаболита существенно увеличивалось с 3 на 4 сутки после инфицирования (эффект суток: $F_{1,19} = 9.3$, $P = 0.007$). В парализованных гусеницах содержание кордицепина оказалось существенно ниже, чем в не парализованных (эффект парализации: $F_{1,19} = 13.0$,

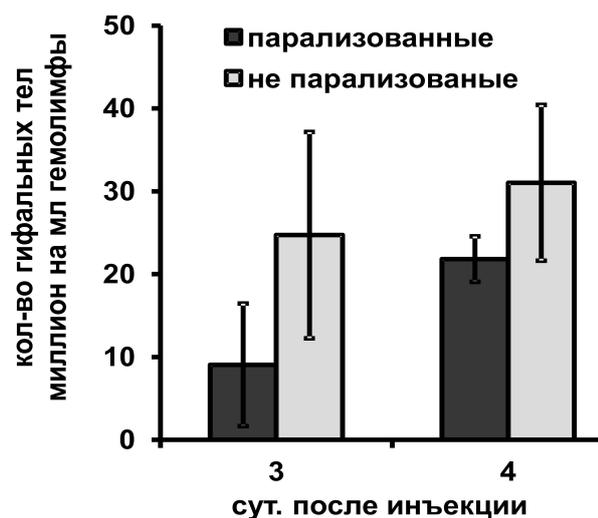


Рисунок 10. Количество гифальных тел в личинках воцинной огневки *G. mellonella* на 3 и 4 сутки после инъектирования бластоспор *C. militaris*. Вертикальные линии показывают ошибки средних арифметических.

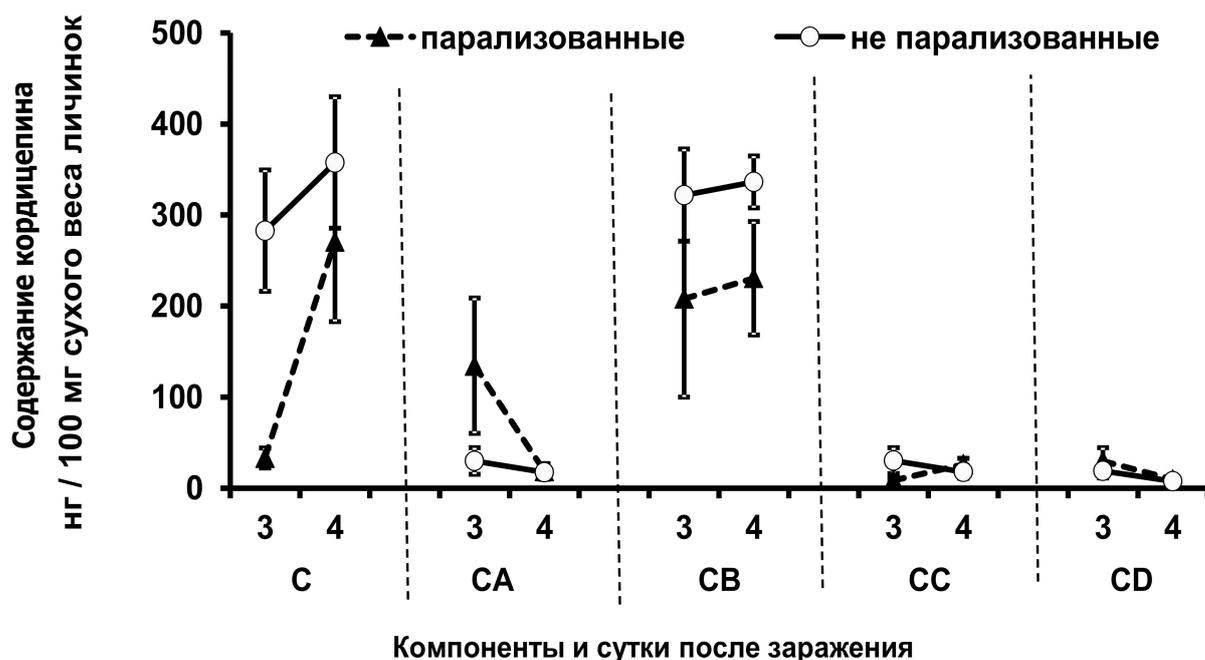


Рисунок 11. Концентрации кордицепина (C) и кордицепиамидов А, В, С и D (CA, CB, CC и CD соответственно) в личинках воцинной огневки *G. mellonella* на 3 и 4 сутки после инъектирования бластоспор *C. militaris*. Вертикальные линии показывают ошибки средних арифметических.

$P = 0.002$). При этом значительные (8.5-кратные) различия отмечались на 3-и сутки после инфицирования (Тьюки тест: $P = 0.004$), а на 4-е сутки

содержание кордицепина в парализованных личинках было лишь в 1.3 раза ниже, чем в не парализованных и отличалось не существенно (Тьюки тест: $P = 0.72$).

Вторым мажорным метаболитом гриба, детектируемым в зараженных личинках, был кордицепиамид В. Его содержание составляло в среднем 277 ± 32 нг/на 100 мг сухой массы гусениц. Как и у кордицепина, концентрация данного метаболита оказалась ниже в парализованных гусеницах по сравнению с не парализованными ($F_{1,19} = 5.9$, $P = 0.026$). Также наблюдалась тенденция к повышению концентрации в зависимости от времени после заражения, но эффект оказался несущественным ($F_{1,19} = 0.47$, $P = 0.50$). Корреляции между концентрацией бластоспор в гемолимфе и содержанием обоих компонентов – кордицепина и кордицепиамида В – оказались на уровне отчетливых тенденций ($r = 0.38$, $P = 0.07$ и $r = 0.35$, $P = 0.10$ соответственно). Корреляция между уровнем кордицепина и кордицепиамида В была тесной и высокодостоверной ($r = 0.74$, $P < 0.0001$). Кордицепиамиды А, С и D были обнаружены в зараженных гусеницах в значительно меньших количествах (Рис. 11) и существенных трендов, связанных с парализацией и временем после заражения не выявлено.

Сниженное количество гифальных тел в парализованных паразитоидом личинках и более медленное накопление кордицепина, по всей видимости, обусловлены отсутствием циркуляции гемолимфы после парализации. Динамика накопления кордицепина зависела (на уровне тенденции) от скорости колонизации гемоцеля у парализованных и не парализованных личинок. Следует отметить, что при инфекциях *C. militaris*, а также скармливания насекомым его культуральных фильтратов происходило ингибирование клеточного иммунитета (Крюков и др. 2014; 2015). Однако, полученные результаты свидетельствуют о том, что кордицепин, видимо, не является индуцибельным токсином, то есть продуцируемым в ответ на иммунные реакции хозяина. Подъем концентрации кордицепина в

парализованных личинках идет с запаздыванием, но достигает почти того же уровня как в не парализованных насекомых к 4-м суткам после обработки. В работах Х. Хур (Hur, 2008) показано, что кордицепин содержится в большем количестве в стромах гриба, чем в мумиях насекомых. Для достижения инсектицидного действия или подавления развития вощинной огневки необходимы в сотни раз более высокие дозы кордицепина (Крюков и др., 2015), чем мы детектировали в насекомых в настоящей работе. Подобные результаты были получены в недавнем исследовании А. Риос-Морено (Ríos-Moreno et al., 2017) при анализе содержания деструксина А (метаболита грибов *Metarhizium*) в личинках вощинной огневки. То есть, в зараженных личинках содержание деструксинов было существенно ниже, чем требуется для достижения инсектицидных эффектов. Однако, это не исключает локального подавления иммунитета кордицепином в местах, где происходит инкапсуляция гриба и выход патогена из капсул.

Интересно, что детектированные в личинках кордицепиамиды А, В, С и D ранее не были известны у гриба *C. militaris*. Кроме того, эти соединения не обнаруживаются в культурах исследуемого изолята, выращенных на искусственных питательных средах (Берестецкий, Тюрин и др., неопубликованные данные). Вероятно, для запуска синтеза данных соединений необходим определенный состав питательного субстрата, характерный для гемолимфы насекомых. Динамика накопления кордицепиамида В, как и в случае с кордицепином, происходила существенно медленнее в парализованных личинках, что вероятно, также обусловлено отсутствием циркуляции гемолимфы. Работы, посвященные биологической активности кордицепиамидов, единичны и касаются только их противовоспалительной активности в культурах клеток мышей (Chang et al., 2017). В тоже время для ряда природных и синтетических амидов показаны инсектицидные свойства (Siddiqui et al., 2005; Batista-Pereira et al.,

2006), поэтому вполне возможно, что они обладают иммуносупрессирующими свойствами.

Таким образом, при инъекциях гриба *C. militaris* в гемоцель мы не наблюдали существенных различий в уровне смертности парализованных и не парализованных насекомых, что свидетельствует о важности кутикулярных изменений при парализации. Накопление гифальных тел и токсинов грибов в парализованных личинках шло медленнее, что, вероятнее всего, связано с нарушением циркуляции гемолимфы под действием яда паразитоида. Отметим, что в данной работе мы впервые получили результаты, касающиеся физиологических концентраций кордицепина и кордицепиамидов в насекомых при развитии микоза *C. militaris*.

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

Сопутствующая бактериальная микрофлора кишечника может существенно влиять на развитие различных патологий, вызываемых бактериями, грибами и паразитоидами у насекомых (Kaltenpoth & Engl, 2013; Douglas, 2015). В частности, увеличение численности некоторых кишечных бактерий (например, *S. marcescens*) усиливает восприимчивость насекомых к грибу *B. bassiana* (Wei et al., 2017). Однако, такие примеры в литературе пока единичны. Было отмечено, что личинки вощинной огневки, парализованные ядом *H. hebetor*, не редко погибают от спонтанных бактериозов (Н.А. Крюкова, устное сообщение). Причиной этому может служить замедление перистальтики кишечника, наблюдаемое после парализации, либо непосредственное действие токсинов яда на микробиоту. В данной главе мы попытались ответить на вопрос, влияет ли парализация на изменение бактериального сообщества среднего кишечника вощинной огневки, и могут ли эти изменения сказаться на восприимчивости к грибам.

В работе использовали парализованных и не парализованных ядом личинок, которых перкутанно инфицировали конидиями *B. bassiana* (1×10^6 конидий/мл). Затем проводили учет гибели от микозов и бактериозов. Анализ микробиоты проводили на 3-и сутки после парализации и заражения грибом.

Инфицирование не парализованных личинок конидиями *B. bassiana* приводило к 12% смертности личинок от микоза на 12 сутки после обработки (Рис. 12), что существенно отличалось от контроля ($\chi^2 = 6.4$, $P = 0.01$). Обработка парализованных личинок грибом приводила к 90% смертности от гриба ($\chi^2 = 60.1$, $P < 0.0001$, по сравнению с не парализованными личинками). Развитие спонтанных бактериозов было наиболее высоким в парализованных, но не инфицированных грибом личинках (30%) ($\chi^2 > 6.3$, $P < 0.01$, по сравнению с остальными вариантами эксперимента). Грибная

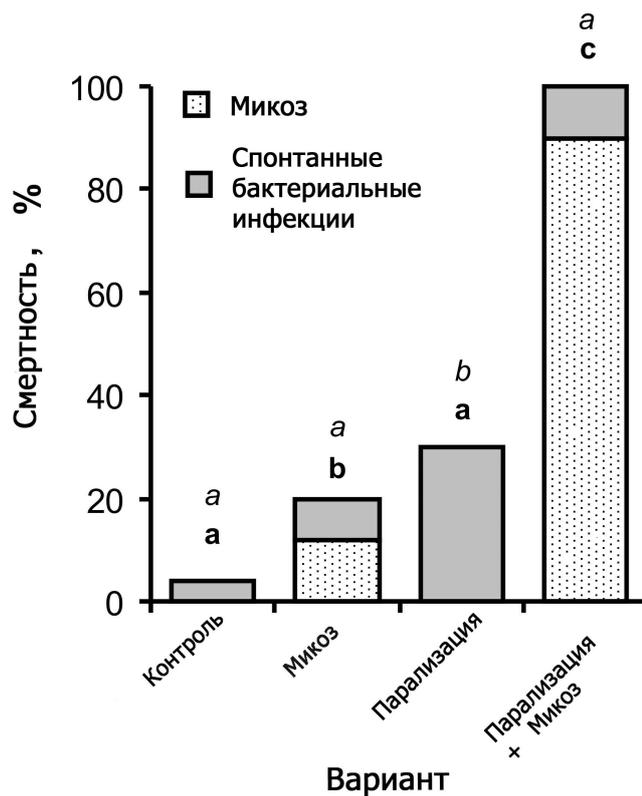


Рисунок 12. Смертность личинок воцинной огневки на 12 сутки после парализации *H. hebetor* и/или заражения *B. bassiana* (10^6 конидий/мл). Одинаковые буквы, выделенные курсивом, указывают на несущественные различия в частоте бактериозов между вариантами, одинаковые жирные буквы указывают на несущественные различия в смертности от инфекции *B. bassiana* между вариантами ($\chi^2 < 2.3$; $P > 0.08$).

инфекция приводила к существенному снижению уровня спонтанных бактериозов у парализованных личинок (10%) ($\chi^2 = 6.3$, $P = 0.01$).

Изменение структуры сообществ среднего кишечника воцинной огневки, изучалось с помощью секвенирования гена 16S рРНК в тотальной ДНК, выделенной из кишечника насекомых на платформе Miseq Illumina. В целом, данный анализ выявил 176 операционных таксономических единиц (ОТЕ), которые сгруппировались в 117 таксонов родового уровня, 72 таксона уровня семейств и 11 таксонов уровня типа (база данных доступна на

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-40301-6>) Во всех вариантах доминирующими типами были: *Proteobacteria* (62.9%) с преобладанием семейства *Enterobacteriaceae*, а также *Firmicutes* (35.7%) с преобладанием семейства *Enterococcaceae*.

Таблица 1. Характеристики разнообразия микробиоты в среднем кишечнике воцинной огневки через 72 часа после парализации *H. hebetor*, заражения грибом *B. bassiana* и при комбинации обоих факторов.

	ОТЕ	Роды	Семейства	Индекс Шеннона *
Контроль	54 ± 2.9 ^a	43 ± 2.4 ^a	31 ± 1.4 ^a	0.9 ± 0.32 ^{ab}
Микоз	45 ± 4.6 ^{ac}	37 ± 3.9 ^{ac}	28 ± 2.9 ^a	1.4 ± 0.44 ^a
Парализация	13 ± 4.6 ^b	11 ± 3.7 ^b	10 ± 2.8 ^b	0.3 ± 0.11 ^b
Парализация + микоз	15 ± 2.3 ^{bc}	14 ± 1.9 ^{bc}	11 ± 1.0 ^b	0.9 ± 0.21 ^{ab}

* - Индекс Шеннона рассчитан для родового уровня.

Стандартная ошибка (± SE) рассчитана для четырех повторностей. Одинаковые буквы указывают на несущественные различия (тест Данна: $P > 0.05$).

Парализация воцинной огневки паразитоидами приводила к резкому сокращению разнообразия бактериального сообщества (Таблица 1), в частности, значительному снижению количества ОТЕ, родов и семейств (двухфакторный анализ Шейрера-Рэя-Хейра, эффект парализации: $H_{1,15} > 11.3$, $P < 0.001$). Также наблюдалась тенденция к снижению индекса Шеннона при парализации ($H_{1,15} = 2.8$, $P = 0.09$). Эффект грибной инфекции на таксономическое разнообразие микробиоты кишечника был не значительным ($H_{1,15} < 0.3$, $P > 0.6$). Однако, тенденция к увеличению индекса Шеннона наблюдалась в ответ на развитие микоза ($H_{1,15} = 3.2$, $P = 0.07$) вследствие выравнивания обилия между доминирующими группами бактерий (см. ниже).

В исследуемых образцах преобладали три ОТЕ: ОТЕ 1 – неклассифицированные *Enterobacteriaceae*, ОТЕ 2 - *Enterococcus* и ОТЕ 6 - *Serratia* (Рис. 13А). Контрольные (нативные) личинки характеризовались высоким обилием энтерококков (*Enterococcus*) ($88 \pm 4.7\%$) и относительно низким обилием энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*) ($< 8.2\%$) в среднем кишечнике. Парализация приводила к значительным изменениям в структуре бактериального сообщества, в частности происходило увеличение доли энтеробактерий и уменьшение обилия энтерококков ($H_{1.15} = 7.45$, $P = 0.006$). Тенденция к увеличению обилия энтеробактерий отмечена после инокуляции грибом, но разница была несущественной в сравнении с контрольной группой насекомых (тест Данна: $P = 0.075$). Тем не менее, увеличение обилия *Serratia* наблюдалось во время развития острого микоза у парализованных личинок (тест Данна: $P < 0.04$, по сравнению с другими вариантами).

Анализ главных компонент (Рис. 13В) показал, что первая компонента объясняет 84.9% различий, что связано с изменениями в пропорции между энтеробактериями (ОТЕ 1) и энтерококками (ОТЕ 2). Отчетливая кластеризация наблюдается между парализованными и не парализованными (контрольными) личинками. Зараженные грибом личинки занимали промежуточное положение. Вторая компонента объясняла только 14.2% вариации, что вызвано увеличением ОТЕ 6 (*Serratia*) у зараженных грибом личинок.

Мы предположили, что значительное обеднение микробиома при парализации связано с резким увеличением численности энтеробактерий. Поэтому мы провели анализ количества колониеобразующих единиц (КОЕ) среднего кишечника, используя селективные среды.

Посев содержимого среднего кишечника на селективные питательные среды показал увеличение КОЕ всех доминантных бактерий (*Enterococcus*, *Enterobacter* и *Serratia*) при парализации воцинной огневки (Рис. 14).

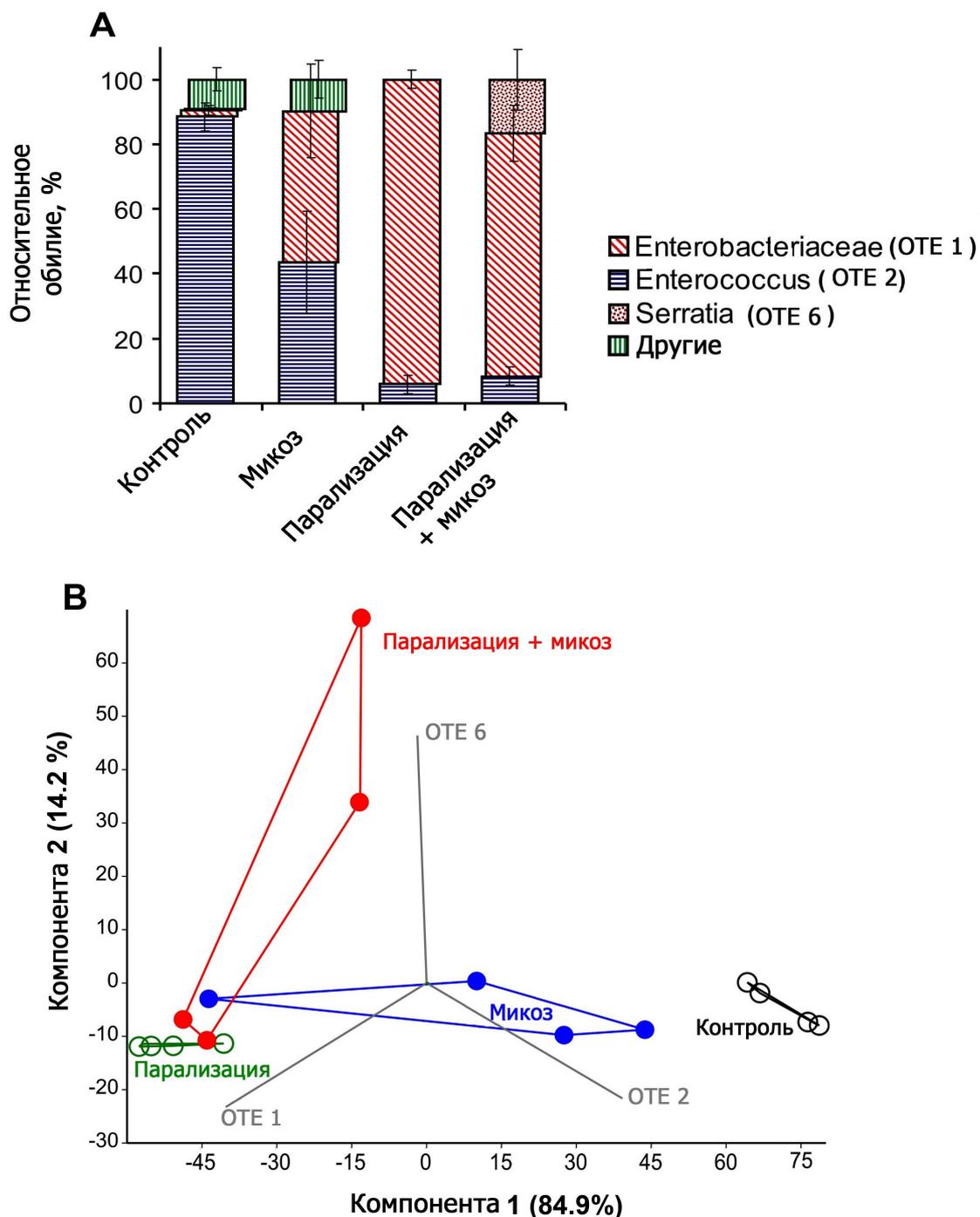


Рисунок 13. Изменение состава микробиоты среднего кишечника у личинок вошинной огневки через 72 часа после парализации *H. hebetor*, заражения *B. bassiana* и действия обоих факторов. А - Гистограмма, показывающая изменения на уровне рода. Вертикальные линии показывают ошибку средней арифметической, рассчитанную для четырех повторностей. В - анализ главных компонент микробных сообществ для уровня ОТЕ.

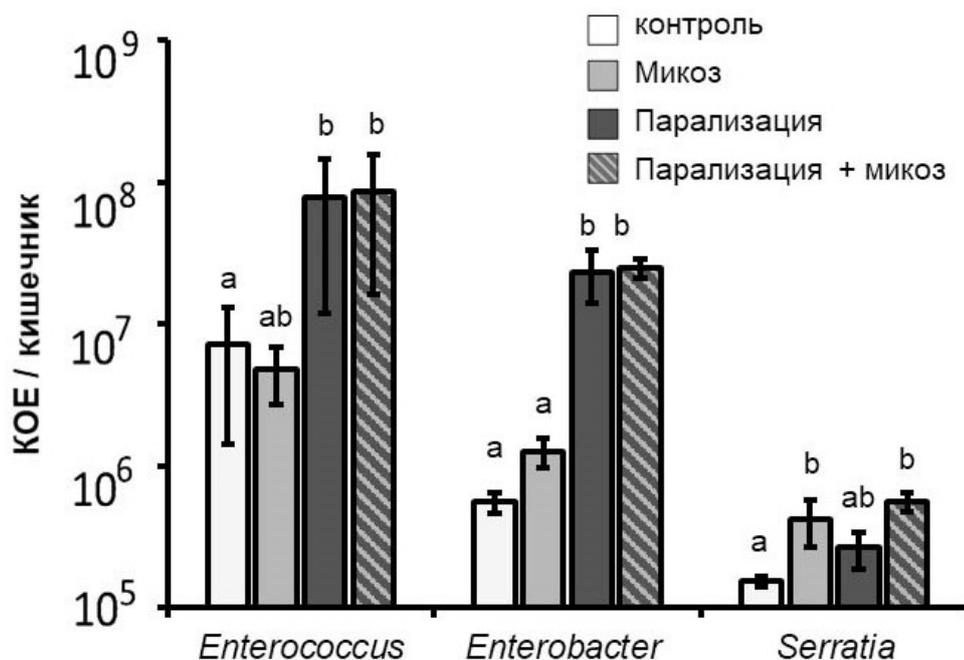


Рисунок 14. Изменения КОЕ культивируемых бактерий среднего кишечника личинок вошинной огневки через 72 часа после парализации *H. hebetor*, заражения грибом *B. bassiana* и совместном действии факторов. Вертикальные столбцы показывают ошибку средней арифметической, рассчитанную из семи повторностей (*Enterococcus*), девяти повторностей (*Enterobacter*) и трех повторностей (*Serratia*). Одинаковые буквы указывают на несущественные различия (тест Данна: $P > 0.05$).

Следует отметить, что парализация приводила к увеличению КОЕ *Enterococcus* в 10-12 раз, в тоже время количество КОЕ *Enterobacter* увеличивалось в 42-45 раз (эффекты парализации: $H_{1,27} = 8.1$, $P = 0.004$ для *Enterococcus* и $H_{1,35} = 19.9$, $P < 0.0001$ для *Enterobacter*). Грибная инфекция не оказывала значительного влияния на КОЕ бактерий *Enterococcus* и *Enterobacter* ($H < 1.6$, $P > 0.26$), однако, она влияла на количество бактерий *Serratia*. В частности, развитие микоза привело к увеличению КОЕ *Serratia* у парализованных и не парализованных личинок ($H_{1,11} = 5.8$, $P = 0.016$).

Молекулярно-генетическая идентификация культивируемых бактерий на основе секвенирования 16S рРНК показала, что культуры *Enterococcus*

(n=7) идентичны на 100% типовому штамму *Enterococcus faecalis* JSM5803^T. Пять изолятов *Enterobacter* имели одинаковый молекулярный гаплотип и были идентичны культуре M. pstv. 10.4 (KM108494) *E. hormaechei*. Однако, данные культуры отличались одной заменой от *E. hormaechei* 69-907R (KX828280), и одной заменой от *E. xiangfangensis* 10-17^T (HF679035). Поэтому, из-за неоднозначного филогенетического положения мы обозначили данные изоляты как *Enterobacter* sp. Сиквенсы двух культур *Serratia* были идентичны друг другу и отличались одной нуклеотидной заменой от *S. marcescens* subsp. *marcescens* DSM 30121^T (AJ233431) и штамма *S. marcescens* subsp. *sakuensis* KRED^T (AB061685). Последовательности *E. faecalis* и *S. marcescens* имели 100% идентичность с ОТЕ 2 (*Enterococcus*) и ОТЕ 6 (*Serratia*), соответственно. Последовательности изолятов *Enterobacter* sp. демонстрировали 99.4% идентичность с ОТЕ 1 (*Enterobacteriaceae*).

Для того чтобы установить, могут ли исследуемые бактерии оказывать влияние на восприимчивость вошинной огневки к грибу *B. bassiana* мы провели биотесты, в которых добавляли суспензию этих бактерий в корм насекомых. При этом использовали личинок огневки, зараженных и не зараженных конидиями *B. bassiana*. Скармливание личинкам бактерий *E. faecalis*, *Enterobacter* sp. и *S. marcescens* не приводило к гибели личинок вошинной огневки по сравнению с не инфицированным контролем (лог-ранк тест: $\chi^2 < 0.7$, $P > 0.38$; Рис. 15). Однако скармливание бактерий приводило к увеличению восприимчивости к грибу на уровне синергистического эффекта. Синергизм наблюдался через 3–10 дней после заражения ($\chi^2 > 25.3$, $P < 0.001$). Эффекты при скармливании разных бактерий и заражении *B. bassiana* были схожими (увеличение общей смертности на 30-38% и уменьшение времени выживания (ST₇₅) в 2 раза при смешанных инфекциях по сравнению с инфицированием только грибом). Наиболее выраженный синергизм

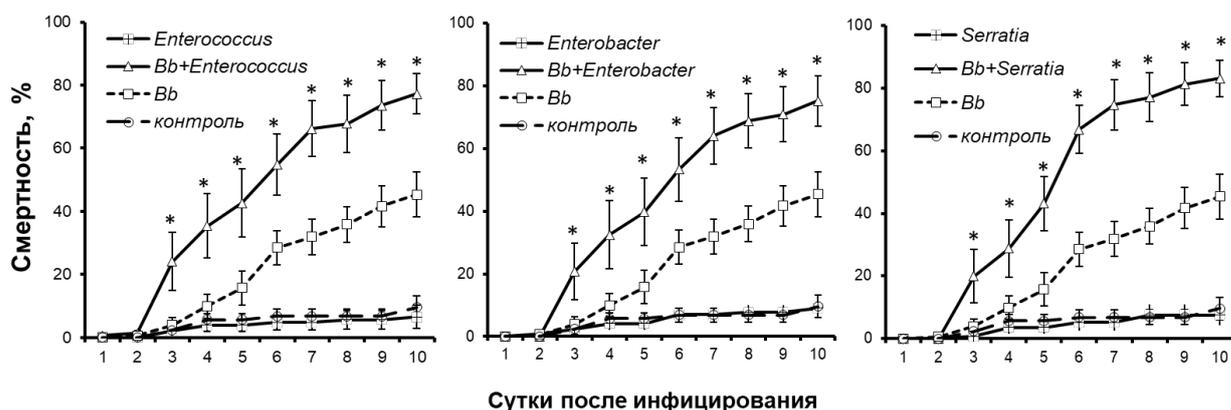


Рисунок 15. Динамика смертности личинок вощинной огневки после скармливания бактерий, выделенных из среднего кишечника (10^8 клеток/3 г корма) и заражения грибом *B. bassiana* (4×10^6 конидий/мл). Данные объединены из трех независимых экспериментов в каждом из которых было не менее 3-х повторностей (1 повторность = 10 личинок). * - синергизм между грибами и бактериями, рассчитанный, как описано Дж. Робертсоном и Х. Прейслером (Robertson & Preisler, 1992).

наблюдался между *B. bassiana* и *S. marcescens* (Рис. 15, см также Приложение, табл. 3). Все личинки, которым скармливали бактерий и заражали грибом после гибели обрастали мицелием.

Проведенное исследование показало, что парализация личинок вощинной огневки паразитоидом *H. hebetor* приводит к неконтролируемому размножению бактерий в кишечнике, падению разнообразия и сдвигу в сообществе от грамположительных энтерококков (в контроле) к грамотрицательным энтеробактериям (при парализации). Кишечник личинок чешуекрылых характеризуется высоким рН и высокой скоростью прохождения через него пищи (Hammer et al., 2017). Постоянное движение пищи в кишечнике вызывает регулярное обновление микробиома и клеток перитрофической мембраны. Парализация личинок огневки ядом вызывает нарушение перистальтики кишечника, что, по всей видимости и приводит к изменению рН, абсорбционных функций клеток кишечника и, в конечном

итоге, дисбиозу. Ранее показано, что в кишечном сообществе лабораторных линий *G. mellonella* доминируют грамположительные бактерии рода *Enterococcus* (Johnston & Rolff, 2015; Dubovskiy et al., 2016; Krams et al., 2017), что согласуется с результатами нашего исследования. Интересно, что похожие сдвиги в структуре сообщества (от грамположительных к грамотрицательным бактериям) наблюдались при других токсикозах. В частности, И.М. Дубовский и соавт. (Dubovskiy et al., 2016) показали, смену доминирования *Enterococcus* на *Enterobacteriaceae* в кишечниках воцинной огневки при развитии инфекции *B. thuringiensis*. В.В. Мартемьянов с соавт. (Martemyanov et al., 2016) регистрировали снижение разнообразия сообщества и увеличение численности грамотрицательных бактерий (*Stella* sp.) у *Lymantria dispar* Linnaeus после инфицирования *B. thuringiensis*. Сходные результаты были получены в ответ на инфицирование имаго комаров *Anopheles stephensi* Liston конидиями *B. bassiana*. Микоз приводил к значительному уменьшению бактериального разнообразия и смещению доминирующих бактерий от *Firmicutes* к *Proteobacteria* (Wei et al., 2017). В частности, острый микоз приводил к увеличению численности *S. marcescens*, что стимулировало развитие грибной инфекции у комаров. Интересно, что мы также обнаружили увеличение численности *Serratia* во время развития острой грибной инфекции у парализованных личинок воцинной огневки.

Г. Уэй с соавт. (Wei et al., 2017) объясняли массовое размножение кишечных бактерий *Serratia* при микозах снижением кишечного иммунитета насекомых. Согласно данным У.Н. Роцкой (неопубликованные данные) в изучаемой нами модели происходит не падение, а напротив, подъем уровня экспрессии антимикробных пептидов (АМП) кишечника при парализации и развитии микоза. В тоже время, экспрессия генов связанных со стрессом и синтезом активированных кислородных метаболитов значительно не меняется. Это говорит о том, что парализованные насекомые способны отвечать на пролиферацию бактерий в кишечнике подъемом АМП, и таким

образом сдерживать развитие септицемии, связанной с проникновением бактерий в гемолимфу, по крайней мере несколько суток. Этого времени достаточно для развития как личинок паразитоида, так и прохождения фаз жизненного цикла гриба. В данном случае мы можем говорить о том, что иммунные реакции хозяина (*G. mellonella*), направленные на подавление бактериальных агентов, оказываются полезными для развития паразитоидов или грибов. То есть благодаря реакциям иммунитета хозяина у паразитоидов и грибов имеется время, что бы опередить развитие системного бактериоза.

Интересно, что пероральное заражение огневки всеми тремя культивируемыми бактериями, а именно *E. faecalis*, *Enterobacter sp.* и *S. marcescens*, не вызывали смертности, но значительно повышали восприимчивость личинок к *B. bassiana*. Полученные данные показывают, что дополнительная нагрузка кишечными бактериями может стимулировать развитие микоза. Механизм наблюдаемого синергистического эффекта пока не известен и требует дальнейших исследований. Мы можем только предполагать, что в данном случае происходит перераспределение иммунных реакций в разных органах и их системах. Например, И. Крамс и его коллеги (Krams et al., 2017) показали, что увеличение численности кишечных бактерий приводит к снижению уровня инкапсуляции у личинок воцинной огневки. Поэтому, вполне возможно, что нарушение баланса в сообществе бактерий приводит к изменению иммунных реакций в гемолимфе и покровах насекомых. Кроме того, в данной модели возможна супрессия антигрибных защитных реакций метаболитами бактерий, как, например, показано на системе *Spodoptera exigua* Hübner – *Xenorhabdus nematophila* – *B. bassiana* (Park & Kim, 2011).

Таким образом, нами установлено влияние парализации насекомых ядом паразитоида на структуру кишечной микробиоты хозяина. Мы показали, что парализация приводит к обеднению сообщества бактерий вследствие массового размножения грамотрицательных форм (*Enterobacter*).

Повышение численности кишечных бактерий усиливает восприимчивость насекомых к грибам. Отметим, что многие исследователи рассматривали механизмы синергизма между энтомопатогенными грибами и токсикантами (кишечного или системного действия) на основе изменений в гуморальном и клеточном иммунитете. Однако, вклад этих токсикантов в изменение микробного сообщества практически не изучался. Наше исследование показывает, что изменения в структуре кишечной микробиоты может быть важной причиной синергизма между патогенами и токсикантами.

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

Известно что, энтомопатогенные аскомицеты постоянно присутствуют в почвах, но часто имеют низкий инфекционный фон, а также средний или низкий уровень вирулентности (Борисов и др., 2001; Zimmermann, 2007; Sheepmaker, Butt, 2010). Кроме того, предполагается, что энтомопатогенные аскомицеты наиболее адаптированы к инфицированию насекомых, ослабленных различными стрессовыми воздействиями (Boomsma et al., 2014). Поскольку мы установили существенное влияние парализации на восприимчивость личинок к энтомопатогенным (но не сапротрофным) грибам, мы предположили, что данный феномен может быть использован для усовершенствования метода приманок, применяемого для выделения грибов из почв. Данный метод является одним из наиболее распространенных и наименее трудоемких методов. Изначально он был предложен для изоляции из почвы энтомопаразитических нематод (Mraeek, 1980; Akhurst & Brooks, 1984), а затем для выделения грибов (Zimmermann, 1986). Важно отметить, что одно из ограничений данного метода связано с разными уровнями восприимчивости насекомых-приманок к определенным видам грибов (Sheepmaker & Butt, 2010). Например, чувствительность к аскомицетам у разных лабораторных популяций *G. mellonella* значительно варьирует, причем некоторые линии устойчивы к таким широко распространенным аскомицетам, как *Metarhizium* (Dubovskiy et al., 2013b). Мы предположили, что снижение резистентности к грибам у парализованных ядом личинок может быть использовано для повышения эффективности метода приманок. Поэтому мы оценивали чувствительность данного метода при использовании парализованных и не парализованных ядом личинок, а также апробировали модифицированный метод на почвах из разных биоценозов и природно-климатических зон России и Казахстана.

В первом эксперименте мы использовали стерильную почву, инокулированную разными концентрациями конидий *B. bassiana* с последующей экспозицией в ней личинок *G. mellonella*. Было установлено, что применение в качестве ловушек личинок, парализованных ядом паразитоида, увеличивает чувствительность метода в 193 раза (Рис. 16). Так при использовании парализованных личинок полулетальная доза для развития микоза *B. bassiana* составила всего 28 конидий/г почвы (границы 95%-ных доверительных интервалов – 18 и 45 конидий/г почвы), тогда как при использовании интактных личинок полулетальная доза составила 5434 конидии/г почвы (границы 95%-ных доверительных интервалов – 2826 и 10449 конидий/г почвы).

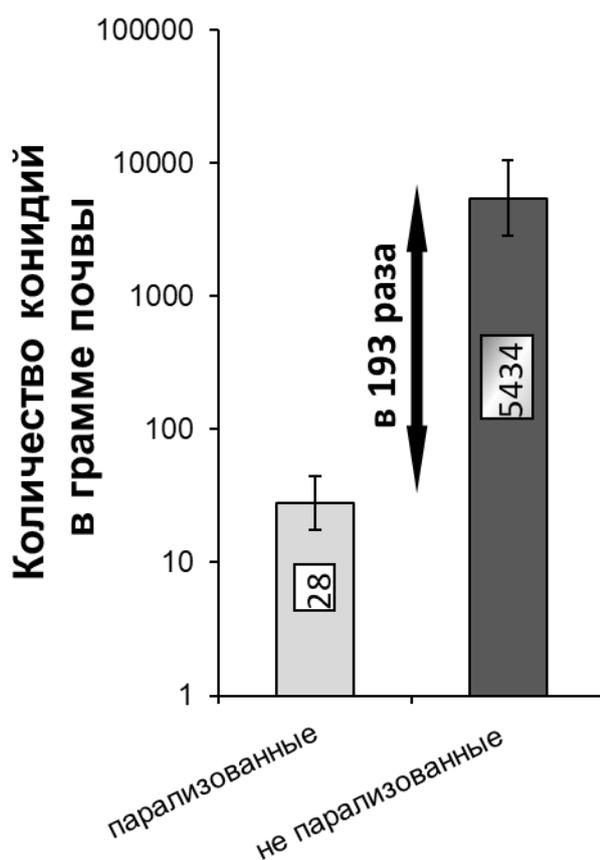


Рисунок 16. Полулетальные концентрации (LC₅₀) *B. bassiana* конидий/г почвы для интактных и парализованных ядом *H. hebetor* гусениц *G. mellonella*.

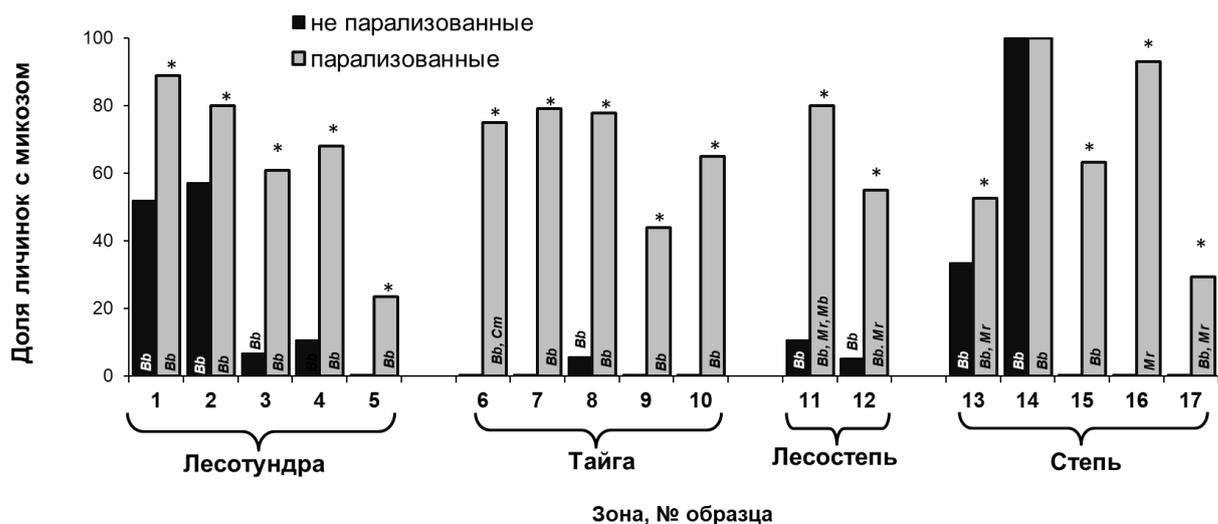


Рисунок 17. Доля пораженных энтомопатогенными аскомицетами гусениц *G. mellonella*, не парализованных и парализованных ядом паразитоида, после экспозиции в почвах из разных природно-климатических зон. 1–5 – окр. Лабытнанги (лиственничные редколесья), 6–10 – окр. Сыктывкара (6 – березовый лес, 7–9 – еловые и елово-широколиственные леса, 10 – черемуховые ассоциации), 11, 12 – окр. пос. Курундус Новосибирской обл. (11 – березовый лес, 12– разнотравно-злаковые ассоциации), 13–15 окр. г. Карасук Новосибирской обл. (13 – разнотравно-дерновинно-злаковая степь, 14, 15 – опушки березовых колков), 16 – окр. Краснодара (пойменный луг с пастбищной дигрессией), 17– окр. Алматы (разнотравная степь). Vb – *V. bassiana*, Mr – *M. robertsii*, Mb – *M. brunneum*, Cm – *C. militaris*. * – $\chi^2 > 4.15$, $df = 1$, $P < 0.042$.

В следующем эксперименте мы апробировали данный метод на почвах из разных природных зон (от тундр до степей). Для большинства исследуемых образцов показано статистически достоверное увеличение доли личинок с развившимся микозом после парализации ядом (Main effect Anova: $F = 65.6$, $df = 1.16$, $P = 0.000001$; Рис. 17). Только в одном образце (№ 14) как у парализованных, так и не парализованных гусениц была отмечена 100%-я

гибель от микозов. Было выделено четыре вида энтомопатогенных аскомицетов (*B. bassiana sensu lato*, *M. robertsii*, *M. brunneum* и *C. militaris*), при этом грибы р. *Metarhizium* и *Cordyceps* были изолированы только из парализованных гусениц.

Следует отметить, что методом посева на питательные среды мицелия из склероциев мумифицированных личинок были выделены исключительно энтомопатогенные формы (*Metarhizium*, *Beauveria*, *Cordyceps*). Однако при помещении тех же самых мумий во влажные камеры в 45% случаев на них формировался поверхностный рост сапротрофных грибов *Mucorales*, *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. и *A. flavus*. То есть метод посева из склероциев оказался более эффективным.

Полученные данные согласуются с результатами, представленными в главе 3.1. В частности, инокуляция парализованных личинок почвой приводит к мумификации за счет энтомопатогенных грибов, хотя сапротрофные формы могут развиваться на поверхности насекомых. Предложенная модификация метода приманок значительно повышает его чувствительность, что позволяет выделять грибы из почв с низкой численностью конидий. Такими почвами, в частности, могут быть степные, где условия для развития энтомопатогенов субоптимальны из-за высоких температур и низкой влажности. При этом штаммы из степных почв могут представлять особую ценность, поскольку они чаще характеризуются высокой ксерофильностью и термотолерантностью, что делает их перспективными для биологического контроля насекомых в условиях континентального климата (Ильичева и др., 1976; Леднев и др., 2012; Rangel et al., 2005; Kryukov et al., 2012). Использование модифицированного метода приманок может позволить получать новые данные по распространению и экологии энтомопатогенных грибов. Например, с помощью данного метода нами было показано, что грибы р. *Metarhizium* не являются редкими представителями микробиоты в условиях континентального климата России,

как считалось ранее (Polovinko et al., 2010). Также выявлено, что в отличие от наиболее распространенных грибов *Beauveria* виды *Metarhizium* тяготеют к лесостепной и степной зонам, что, вероятно, связано с их более низкой психротолерантностью (Bidochka et al., 1998).

В последующем возможны модификации данного метода с использованием коммерчески доступных ядов членистоногих или других способов подавления иммунитета у насекомых-приманок. Данный метод позволит быстро детектировать энтомопатогенные грибы не только в почвах, но также в филлосфере и ризосфере растений, древесине, воде и других природных источниках.

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 вошинной 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 насекомые-хозяева могут быть инфицированы как за счет прямого контакта с паразитоидом, так и путем контаминации субстрата паразитоидом конидиями грибов. Введение конидий яйцекладом в гемоцель не является обязательным условием для успешного распространения микоза.

Возможность успешной трансмиссии в исследуемой модели определяется многократным падением устойчивости вощинной 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 углеводы 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 скармливание 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 понимание подобных феноменов требует дальнейших исследований.

С эколого-эволюционной точки зрения возникает вопрос, почему *H. hebetor* не сформировал надежных механизмов защиты своих личинок и 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 вощинной огневки в местах питания личинок *H. hebetor*, однако, при завершении питания паразитоида личинки огневки полностью колонизировались грибами (Kryukov et al., 2018a). 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 *H. hebetor* – *G. mellonella* – 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 эпикуткулярном 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 ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Асякин, Б.П. Растения – нектароносы в биологической защите овощных культур от вредителей / Б.П. Асякин, Л.П. Красавина, Н.А. Белякова. – ВИЗР. Инновац. центр защиты растений. СПб. – 2003. – 44 с.

Белоусов, Ю.В. Оборудование для разведения габробракона / Ю.В. Белоусов, Е.Д. Молчанова, Е.Б. Шейкина // Защита и карантин растений. – 2015. – № 7. – С. 42-43.

Борисов, Б.А. Зоопаразитические кордицепитоидные грибы (Ascomycota, Нуросcreales): о роли эдафического фактора возникновения и угасания эпизоотий в популяциях членистоногих и нематод / Б.А. Борисов // Материалы III межрегиональной научной конференции паразитологов Сибири и Дальнего Востока. – Новосибирск. – 2009. – С. 36-39.

Борисов, Б.А. Энтомопатогенные аскомицеты и дейтеромицеты / Б.А. Борисов, В.В. Серебров, И.И. Новикова, И.В. Бойкова // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты (ред. В.В. Глупов). – М.: Круглый год. – 2001. – 352-427 с.

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

Викторов, Г.А. О происхождении паразитизма наездников / Г.А. Викторов // Тр. Инст. морфол. животных им. А.Н. Северцова. – 1959. – Т. 27. – 261-273 с.

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

Гниненко, Ю.И. Экология тахины *Nemoraea pellucidae* Mg. – паразита куколок хохлаток в Южвом Зауралье / Ю.И. Гниненко // Экология. – 1979. – № 5. – С. 61-65.

Евлахова, А.А. Энтомопатогенные грибы / А.А. Евлахова – Л.: Наука. – 1974. – 260 с.

Ильичева, С.Н. Влияние температуры на развитие гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. / С.Н. Ильичева, О.А. Алешина, Э.И. Кононова, Я.Э. Юршенене // Микология и фитопатология. – 1976. – Т. 10. – № 2. – С. 87-92.

Каспарян, Д.Р. Основные направления в эволюции паразитизма перепончатокрылых насекомых (Hymenoptera) / Д.Р. Каспарян // Энтотомол. обзор. – 1996. – Т. 75. – № 4. – С. 756-813.

Коломиец, Н.Г. Чешуекрылые – вредители березовых лесов / Н.Г. Коломиец, С.Д. Артамонов // Новосибирск: Наука. – 1985. – 129 с.

Крюков, В.Ю. Инсектицидное и иммуносупрессивное действие аскомицета *Cordyceps militaris* на личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* / В.Ю. Крюков, О.Н. Ярославцева., И.М. Дубовский, М.В. Тюрин, Н.А. Крюкова, В.В. Глупов // Изв. Акад. Наук. Сер. биол. – 2014 – №. 3 – С. 296

Крюков, В.Ю. Адаптации энтомопатогенных аскомицетов (Ascomycota, Нуросcreales) к насекомым-хозяевам и факторам среды в условиях континентального климата Западной Сибири и Казахстана / Крюков Вадим Юрьевич – Автореф. дис. докт. биол. наук. Томск: ТГУ. – 2015. – С. 45.

Крюкова, Н.А., Физиологи-биохимические аспекты взаимодействия паразитоидов класса Insecta и их хозяев / Н.А. Крюкова, В.В. Глупов // Паразитология – 2016 – 50. №3. – С. 224-242.

Левченко, М.В. Влияние фазовой изменчивости хозяина на чувствительность перелетной саранчи к энтомопатогенным гифомицетам / М.В. Левченко, В.Ю. Крюков, Г.Р. Леднёв. // Информационный бюллетень ВПРС МОББ – 2007 – №38. – С.156-158.

Леднев, Г.Р. Состояние и перспективы использования энтомопатогенных грибов для контроля численности саранчовых / Г.Р. Леднев, М.В. Левченко, В.Ю. Крюков, П.В. Митьковец, О.Н. Ярославцева, А.М. Успанов, В.А. Павлюшин // Защита и карантин растений. – 2012. – № 6. – С. 18-21.

Малышев, С.И. Перепончатокрылые, их происхождение и эволюция / С.И. Малышев – М.: Советская наука. – 1959. – 297 с.

Мориг, В. Значение лизоцима в антибактериальном иммунитете насекомых. / В. Мориг, Б. Месснер // Журн. Общ. Биол. – 1969. – Т. 30. – № 1. – С. 62-71.

Ройтман, В.А. Паразитизм как форма симбиотических отношений / В.А. Ройтман, С.А. Беэр – М: Товарищество научных изданий КМК. – 2008. – 310 с.

Славнова, Т.И. Действие токсина из яда наездника *Habrobracon hebetor* (Say) на нервно мышечную передачу насекомых / Т.И. Славнова, С.М. Антонов, Л.Г. Магазник, А.К. Тонких, А.В. Косовский, А.А. Садыков, А.А. Абудвахвбов // Физиология. – 1987. – С. 492-494.

Сугоняев, Е.С. Морфо-биологические группы хальцид (Hymenoptera, Chalcidoidea), паразитирующих на червцах и щитовках (Homoptera, Coccidoidea) / Е.С. Сугоняев // Изв. Акад. Наук. Сер. биол. – 1962. – № 5. – С. 754-766.

Суздальская, М.В. О связи личинок златоглазки (*Chrysopa ventralis* Curt. ssp *prasina* Burm.) с грибами белой мускардины / М.В. Суздальская // Зоол. журн. – 1956. – Т. 35. – № 10. – С. 1585-1586.

Тамарина, Н.А. Техническая энтомология – новая отрасль прикладной энтомологии / Н.А. Тамарина // Итоги науки и техники. Сер. Энтومол. – 1987. – Т. 7. – С. 1–247.

Тобиас, В.И. Паразитические насекомые–энтомофаги, их биологические особенности и типы паразитизма / В.И. Тобиас // Труды РЭО. – 2004. – Т. 75. – №. 2. – С. 1-148.

Тряпицын, В.Ф. Паразиты и хищники вредителей сельскохозяйственных культур / В.Ф. Тряпицын, В.Ф. Шапиро В.Ф., В.Ф. Щепетильникова // Л. – 1982. – 55 с.

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

Тюрин, М.В. Сравнительный анализ иммунного ответа личинок колорадского жука при развитии микозов, вызванных *Metarhizium robertsii*, *M. brunneum* и *M. pempfigi* / 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.

Черногуз, Д.Г. Стратегия и тактика паразитирования у парепончатокрылых: Пищевая специализация насекомых./ Д.Г. Черногуз // Тр. ЗИН РАН. – 1993. – Т. 193.– С. 140-243.

Adarkwah, C. Ability of the larval ectoparasitoid *Habrobracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae) to locate the rice moth *Corcyra cephalonica* (Stainton, 1865) (Lepidoptera: Pyralidae) in bagged and bulk stored rice / C. Adarkwah, C. Büttner, C. Reichmuth, D. Obeng-Ofori, S. Prozell, M. Schölle // Journal of Plant Diseases and Protection. – 2010. – V. 117. – № 2. – P. 67-70.

Akhurst, R.J. The distribution of entomophilic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) in North Carolina / R.J. Akhurst, W.M. Brooks // J. Invertebr. Pathol. – 1984. – V. 44. – P. 140-145.

Al-Mazra'awi M.S. Dissemination of *Beauveria bassiana* by honey bees (Hymenoptera: Apidae) for control of tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae) on Canola / M.S. Al-Mazra'awi, J.L. Shipp, A.B. Broadbent, P.G. Kevan // Environmental Entomology. – 2006. – V. 35. – № 6. – P. 1569-1577.

Antolin, M.F. Mating system of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) / M.F. Antolin, P.J. Ode, M.R. Strand // Ecol. Entomol. – 1995. – V. 17. – P. 1-7.

Ashida, M., Brey P.T. Recent advances in research on the insect phenoloxidase cascade / M. Ashida, P.T. Brey // Molecular mechanisms of immune responses in insects (P.T. Brey, D. Hultmark ed). – London: Chapman and Hall. – 1998. – 135–172. p.

Ashida, M. The prophenoloxidase activating system in crayfish / M. Ashida, K. Söderhäll // Comp. Biochem. Physiol. – 1984. – V. 77. – P 21-26.

Baker, J.E. Host hemolymph proteins and protein digestion in larval *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) / J.E. Baker, J.A. Fabrick // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2000. – V. 30. – P. 937–946.

Balevski N. Influence of mycosis caused by *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. to *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pilyidae) upon ectoparasitoid *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) / N. Balevski, S. Draganova // Acta Entomol. Bulg. – 2000. – V. 6. – № 1-2. – P. 52-56.

Bamisile, B.S. Fungal Endophytes: Beyond Herbivore Management / B.S. Bamisile, C.K. Dash, K.S. Akutse, R. Keppanan, L. Wang // Front Microbiol. – 2018. – V. 9. – P. 544.

Batista-Pereira, L.G. Electrophysiological Responses of Eucalyptus Brown Looper *Thyrintea arnobia* to Essential Oils of Seven *Eucalyptus* Species / L.G. Batista-Pereira; J.B. Fernandes, A.G. Corrêa, M.F.G.F. Silva, P.C. Vieira // J. Braz. Chem. Soc. – 2006. – V. 17. – P. 555-561.

Baverstock, J. Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to targeted vectors / J. Baverstock, H.E. Roy, J.K. Pell // BioControl. – 2010. – V. 55. – P. 89–102.

Beard, R.L. The toxicology of *Habrobracon* venom: a study of a natural insecticide / R.L. Beard // Conn. Agric. Expt. Station Bull. – 1952 – P. 562.

Becchminazi, A. Host regulation by the ectophagous parasitoid wasp *Bracon nigricans* / A. Becchimanzi, M. Avolio, I. Di Lelio, A. Marinelli, P. Varricchio, A. Grimaldi, M. de Eguileor, F. Pennacchio, S. Caccia // Journal of Insect Physiology. – 2017. – V. 101. – P. 73-81.

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

Benson, J.F. Intraspecific competition in the population dynamics of *Bracon* / J.F. Benson // Journal of Animal Ecology. – 1973. – V. 42. – № 1. – P. 105-124 (a)

Benson, J.F. The biology of Lepidoptera infesting stored products, with special reference to population dynamics / J.F. Benson // *Biolog. Rev.* – 1973. – V. 48. – P. 1-26.(b)

Bidochka, M.J. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats / M.J. Bidochka, J.E. Kasperski, G.A.M. Wild // *Can. J. Bot.* – 1998. – V. 76. – P. 1198-1204.

Binggeli, O. Prophenoloxidase activation is required for survival to microbial infections in *Drosophila* / O. Binggeli, C. Neyen, M. Poidevin, B. Lemaitre // *PLoS Pathogens.* – 2014. – V. 10. – № 5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004067>

Blackburn, M.B. Enteric bacteria of field-collected Colorado potato beetle larvae inhibit growth of the entomopathogens *Photorhabdus temperata* and *Beauveria bassiana* / M.B. Blackburn, D.E. Gundersen-Rindal, D.C. Weber, P.A.W. Martin, Jr.R.R. Farrar // *Biological Control.* – 2008. – V. 46. – P. 434-441.

Blumberg, D. Parasitoid encapsulation as a defense mechanism in the Coccoidea (Homoptera) and its importance in biological control / D. Blumberg // *Biological control.* – 1997. – V. 8. – P. 225–236.

Bogus, M.I. Effects of insect cuticular fatty acids on *in vitro* growth and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus* / M.I. Bogus, M. Czygier, M. Golebiowski, E. Kedra, J. Kucinska, J. Mazgajska, J. Samborski, W. Wieloch, E. Wloka // *Exp. Parasitol.* – 2010. – V. 125. – P. 400-408.

Boomsma, J.J. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi / J.J. Boomsma, A.B. Jensen, N.V. Meyling, J. Eilenberg // *Annu. Rev. Entomol.* – 2014. – V. 59. – P. 467-485.

Borzoui, E. Adaptation of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) to rearing on *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) / E. Borzoui, B. Naseri, M. Mohammadzadeh-Bidarani // *Journal of Insect Science.* – 2016. – V. 16. – P. 1-7.

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

Broderick, N.A. Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis* induced mortality vary across a range of Lepidoptera / N.A. Broderick, C.J. Robinson, M.D. McMahon, J. Holt, J. Handelsman, K.F. Raffa // *BMC Biol.* – 2009. – V. 7:11 <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-11>

Broderick, N.A. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity / N.A. Broderick, K.F. Raffa, J. Handelsman // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2006. – V. 103. – P. 15196-15199.

Brouchkov, A. Bacterial community in ancient permafrost alluvium at the Mammoth Mountain (Eastern Siberia) / A. Brouchkov, M. Kabilov, S. Filippova, O. Baturina, V. Rogov, V. Galchenko, A. Mulyukin, O. Fursova, G. Pogorelko // *Gene.* – 2017. – V. 636. – P. 48-53.

Brower, J.H. Interaction of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in suppressing stored-product moth populations in small inshell peanut storages / J.H. Brower, J.W. Press // *Journal of Economic Entomology.* – 1990. – V. 83. – P.1096-1101.

Brownbridge, M. Association of entomopathogenic fungi with exotic bark beetles in New Zealand pine plantations / M. Brownbridge, S.D. Reay, N.J. Cummings // *Mycopathologia.* – 2010. – V. 169. – № 1. – P. 75-80.

Bulet, P. Antimicrobial peptides in insects; structure and function / P. Bulet, C. Hetru, J.-L. Dimarcq, D.A. Tomann // *Developmental and Comparative Immunology.* – 1999. – V. 23. – P. 329–344.

Butt, T.M. Entomopathogenic fungi: New insights into host–pathogen interactions / T.M. Butt, C.J. Coates, I.M. Dubovskiy, N.A. Ratcliffe // *Advances in genetics.* – 2016. – V. 94. – P. 307–364.

Caccia, S. Midgut microbiota and host immunocompetence underlie *Bacillus thuringiensis* killing mechanism / S. Caccia, I. Di Lelio, A. La Storia, A. Marinelli, P. Varricchio, E. Franzetti, N. Banyuls, G. Tettamanti, M. Casartelli, B. Giordana,

J. Ferré, S. Gigliotti, D. Ercolini, F. Pennacchio // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2016. – V. 113. – P. 9486-9491.

Carpio A Development of a QuEChERS-based extraction method for the determination of destruxins in potato plants by UHPLC-MS/MS. / A. Carpio, N. Arroyo-Manzanares, A. Ríos-Moreno, I. Garrido-Jurado, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, E. Quesada-Moraga, L. Arce // Talanta. – 2016 – V. 146 – P. 815-22. doi: 10.1016/j.talanta.2015.06.008. 2015

Cardoza, Y.J. Bacteria in oral secretions of an endophytic insect inhibit antagonistic fungi / Y.J. Cardoza, K.D. Klepzig, K.F. Raffa // Ecological Entomology. – 2006. – V. 31. – P. 636-645.

Carreck, N.L. Honey bees can disseminate a microbial control agent to more than one inflorescence pest of oilseed rape / N.L. Carreck, T.M. Butt, S.J. Clark, L. Ibrahim, E.A. Isgar, J.K. Pell, I.H. Williams // Biocontrol Sci. Tech. – 2007. – V. 17. – P. 179–191.

Castellanos-Moguel, J. Virulence testing and extracellular subtilisinlike (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activity during propagule production of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) / J. Castellanos-Moguel, M. Gonzalez-Barajas, T. Mier, M. del Rocio-ReyesMontes, E. Aranda, C. Toriello // Rev. Iberoam Micol. – 2007. – V. 24. – P. 62-68.

Cavelier, F. Natural cyclopeptides as leads for novel pesticides: tentoxin and destruxin / F. Cavelier, J. Verducci, F. Andre, F. Haraux, C. Sigalat, M. Traris, A. Vey // Pesticide Science. – 1998. – V. 52. – № 1. – P. 81-89.

Chang, H.S. Secondary metabolites produced by an endophytic fungus *Cordyceps ninchukispora* from the seeds of *Beilschmiedia erythrophloia* Hayata / H.S. Chang, M.J. Cheng, M.D. Wu, H.Y. Chan, S.Y. Hsieh, C.H. Lin, Y.J. Yech, I.S. Chen // Phytochemistry Letters. – 2017. – V. 22. – P. 179-184.

Charnley, A.K. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins / A.K. Charnley // Adv. Bot. Res. – 2003. – V. 40. – P. 241–321.

Chen, T.T. C-lysozyme contributes to antiviral immunity in *Bombyx mori* against nucleopolyhedrovirus infection / T.T. Chen, L.R. Tan, N. H.u., Z.Q. Dong,

Z.G. H.u., Y.M. Jiang, P. Chen, M.H. Pan, C. Lu.// J Insect Physiol. – 2018. – V. 108. – P. 54-60.

Chen, X. Molecular tracing of white muscardine in the silkworm, *Bombyx mori* (Linn.) II. Silkworm white muscardine is not caused by artificial release or natural epizootic of *Beauveria bassiana* in China / X. Chen, C. Huang, L. He, S. Zhang, Z. Li // Journal of Invertebrate Pathology. – 2015. – V. 125. P. 16-22.

Clark, A.M. Egg production and adult life span in two species of Bracon (Hymenoptera: Braconidae) / A.M. Clark, R.E. Smith // Ann. Entomol. Soc. Am. – 1967. – V. 60. – P. 903-905.

Cline, L.D. Reduction in almond moth (Lepidoptera: Pyralidae) infestation using commercial packaging of foods in combination with the parasitic wasp, *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) / L.D. Cline, J.W. Press // Journal of Economic Entomology. – 1990. – V. 83. – P. 1110-1113.

Cotes, B. Habitat selection of a parasitoid mediated by volatiles informing on host and intraguild predator densities / B. Cotes, L.M. Rännbäck, M. Björkman, H.R. Norli, N.V. Meyling, B. Rämert, P. Anderson // Oecologia. – 2015. – V. 179. – P. 151–162.

Dani, M.P. Venom from the pupal endoparasitoid, *Pimpla hypochondriaca*, increases the susceptibility of larval *Lacanobia oleracea* to the entomopathogens *Bacillus cereus* and *Beauveria bassiana* / M.P. Dani, E.H. Richards, J.P. Edwards // J. Invertebr. Pathol. – 2004. – V. 86. – № 1-2. – P. 19-25.

Dean, P. Microbial infection causes the appearance of hemocytes with extreme spreading ability in monolayers of the tobacco hornworm *Manduca sexta* / P. Dean, E.H. Richards, J.P. Edwards, S.E. Reynolds, K. Charnley // Dev. Comp. Immunol. – 2004. – V. 28. – № 7-8. – P. 689-700.

Dheilly, N.M. Who is the puppet master? Replication of a parasitic wasp-associated virus correlates with host behaviour manipulation / N.M. Dheilly, F. Maure, M. Ravallec, R. Galinier, J. Doyon, D. Duval, L. Leger, A.N. Volkoff, D. Missé, S. Nidelet, V. Demolombe, J. Brodeur, B. Gourbal, F. Thomas, G. Mitta // Proc Biol Sci. – 2015. – <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2773>

Dos Santos, H.J.G. Interaction of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and the Parasitoid *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae) with Larvae of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) / H.J.G. Dos Santos, E.J. Marques, R. Barros, M.G.C. Gondim // Neotrop. Entomol. – 2006. – V. 35. – № 2. – P. 241-245.

Douglas, A.E. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms / A.E. Douglas // Annu. Rev. Entomol. – 2015. – V. 60. – P. 17-34.

Draganova, S. N. Mycosis of larvae *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) parasitized by *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) / S. Draganova, N. Balevski / S. N. Draganova, N. Balevski // Acta Entomol. Bulg. – 2000. – V. 6. – № 1-2. – P. 29–33.

Driver, F. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data / F. Driver, R.J. Milner, J.W.H. Trueman // Mycol. Res. – 2000. – V. 104. – № 2. – P. 134-150.

Dubovskiy I.M. Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi? / I.M. Dubovskiy, M.M.A. Whitten, O.N. Yaroslavtseva, C. Greig, V.Y. Kryukov, E.V. Grizanova, K. Mukherjee, A. Vilcinskas, V.V. Glupov, T.M. Butt // PLOS ONE – 2013 [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060248\(a\)](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060248(a))

Dubovskiy, I.M. Immuno-physiological adaptations confer wax moth *Galleria mellonella* resistance to *Bacillus thuringiensis* / I.M. Dubovskiy, E.V. Grizanova, M.M.A. Whitten, K. Mukherjee, C. Greig, T. Alikina, M. Kabilov, A. Vilcinskas, V.V. Glupov, T.M. Butt // Virulence. – 2016. – V. 7. – P. 860-870.

Dubovskiy, I.M. More than a colour change: Insect melanism, disease resistance and fecundity / I.M. Dubovskiy, M.M.A. Whitten, V.Y. Kryukov, O.N. Yaroslavtseva, E.V. Grizanova, C. Greig, K. Mukherjee, A. Vilcinskas, P. Mitkovets, V.V. Glupov, T.M. Butt // Proc. Roy. Soc. B. – 2013. – V. 280. – № 1763. – P. 1–10. (b)

Edgar, R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads / R.C. Edgar // Nat. Methods. – 2013. – V. 10. – P. 996-998.

Edgar, R. C. SINTAX, a Simple Non-Bayesian Taxonomy Classifier for 16S and ITS Sequences. Available at <http://biorxiv.org/content/early/2016/09/09/074161>, doi: 10.1101/074161 (2016).

Edsonc, K.M. Virus in a parasitoid wasp: suppression of the cellular immune response in the parasitoid's host / K.M. Edsonc, S.B. Vinson, D.B. Stoltz, M.D. Summe // Science. – 1981. – V. 211. – P. 582-583.

Eggleton, P. Parasitoid species and assemblages: convenient definitions or misleading compromises? / P. Eggleton, K.J. Gaston // Nordic Society Oikos. – 1990. – V. 59. – № 3. – P. 417-421.

Eliopoulos, P.A. Life tables of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) parasitizing *Anagasta kuehniella* and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): effect of host density / P.A. Eliopoulos, G.J. Stathas // Journal of Economic Entomology. – 2008. – V. 101. – P. 982-988.

El-Sufty, R. Parasitäre veränderungen der Wirtskutikula bei *Pieris brassicae* und *Cydia pomonella* durch entomophage endoparasiten / R. El-Sufty, E. Führer // Ent. Exp. & Appl. – 1981. – V. 30. – № 2. – P. 134-139.

El-Sufty, R. Wechselbeziehungen zwischen *Cydia pomonella* L. (Lep., Tortricidae), *Ascogaster quadridentatus* Wesm. (Hym., Braconidae) und dem Pilz *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. / R. El-Sufty, E. Führer // Z. Ang. Ent. – 1985. – V. 99. – № 1-5. – P. 504-511.

El-Sufty, R. Wechselbeziehungen zwischen *Pieris brassicae* L. (Lep., Pieridae), *Apanteles glomeratus* L. (Hym., Braconidae) und dem Pilz *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. / R. El-Sufty, E. Führer // Z. Ang. Ent. – 1981. – V. 92. – № 1-5. – P. 321-329.

Enge, P. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. / P. Engel, N. A. Moran // FEMS Microbiol. – 2013.Rev. V. 37, P. 699-735.

Er, A. Venom-induced immunosuppression: an overview of hemocyte-mediated responses / A. Er, O. Sak, E. Ergin, F. Uckan, D.B. Rivers // Psyche. – 2011. – V. 2011. – P. 1-14. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/276376>

Fadrosh, D. W. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. / D.W. Fadrosh, B. Ma, P. Gajer, N. Sengamalay, S. Ott, R. M. Brotman, J. Rave // *Microbiome*. – 2014 doi:10.1186/2049-2618-2-6

Flanders, S.E. Particularities of diverse egg depositions phenomena characterizing carnivoroid Hymenoptera (with morphological and physiological correlations) / S.E. Flanders // *Can. Entomol.* – 1973. – V. 105. – P. 1175-1187.

Flexner, J.L. The effects of microbial pesticides on non-target, beneficial arthropods / J.L. Flexner, B. Lighthart, B.A. Croft // *Agric. Ecosyst. Environ.* – 1986. – V. 16. – P. 203-254.

Forouzan, M. Temperature-dependent development of *Habrobracon hebetor* (Say) reared on larvae of *Galleria mellonella* / M. Forouzan, M. Amirmaafi, A. Sahragad // *J. Entomol. Res. Soc.* – 2008. – V. 28. – P. 67-68.

Fuentes-Contreras, E. Influence of plant resistance at the third trophic level: interactions between parasitoids and entomopathogenic fungi of cereal aphids / E. Fuentes-Contreras, J.K. Pell, H.M. Niemeyer // *Oecologia*. – 1998. – V. 117. – P. 426-432.

Furlong, M.J. Conflicts between a fungal entomopathogen, *Zoophthora radicans*, and two larval parasitoids of the diamondback moth / M.J. Furlong, J.K. Pell // *J. Invertebr. Pathol.* – 2000. – V. 76. – P. 85-94.

Furlong, M.J. Starvation induced stress and the susceptibility of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, to infection by *Beauveria bassiana* / M.J. Furlong, E. Groden // *J. Invertebr. Pathol.* – 2003. – V. 83. – № 2. – P. 127-138.

Gao, Q. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. / Q. Gao, K. Jin, S.H. Ying, Y. Zhang, G. Xiao, Y. Shang, Z. Duan, X. Hu, X.Q. Xie, G. Zhou, G. Peng, Z. Luo, W. Huang, B. Wang, W. Fang, S. Wang, Y. Zhong, L.J. Ma, R.J. St Leger, G.P. Zhao, Y. Pei, M.G. Feng, Y. Xia, C. Wang // *PLoS Genet.* – 2011. – V. 7. – №. 1. – <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001264>

Gaidyshev, I. P. Solving Scientific and Engineering Problems by Means of Excel, VBA, and C++. 512 (St. Petersburg: BKhV-Peterburg, 2004).

Ghimire, M.N. Oviposition and reproductive performance of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) on six different pyralid host species. M.N. Ghimire, T.W. Phillips // *Annals of the Entomological Society of America*. – 2014. – V. 107. – P. 809-817.

Ghimire, M.N. Suitability of different lepidopteran host species for development of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) / M.N. Ghimire, T.W. Phillips // *Environmental Entomology*. – 2010. – V. 39. – P. 449-458.

Gillespie, J.P. Biological mediators of insect immunity / J.P. Gillespie, M.R. Kanost, T. Trenczek // *Annu. Rev. Entomol.* – 1997. – V. 42. – P. 611-643.

Godfray, H.C.J. Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology / H.C.J. Godfray // Princeton University Press. – 1994. – P. 473.

Golebiowski, M. The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection / M. Golebiowski, E. Malinski, M.I. Bogus, J. Kumirska, P. Stepnowski // *Insect Biochem. Mol. Biol.* – 2008. – V. 38. – P. 619-627.

Grau, T. Probiotic *Enterococcus mundtii* isolate protects the model insect *Tribolium castaneum* against *Bacillus thuringiensis* / T. Grau, A. Vilcinskas, G. Joop // *Front Microbiol.* – 2017. – V. 8. – <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01261>

Gressel, J. Microbiome facilitated pest resistance: potential problems and uses / J. Gressel // *Pest Manag. Sci.* – 2018. – V. 74. – P. 511-515.

Grieshop, M.J. biological control of indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae) on finished stored products using egg and larval parasitoids / M.J. Grieshop, P.W. Flinn, J.R. Nechols // *Journal of Economic Entomology*. – 2006. – V. 99. – № 4. – P. 1080-1084.

Guay, J.F. Impact of environmental stress on aphid clonal resistance to parasitoids: Role of *Hamiltonella defensa* bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid / J.F. Guay, S. Boudreault, D. Michaud, C. Cloutier // *J Insect Physiol.* – 2009. – V. 55. – № 10. – P. 919-926.

Gullan, P.J. The insects: an outline of entomology / P.J. Gullan, P.S. Cranston // Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey. – 4th edition. – 2010. – 565 p.

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

Gupta, A.P. Insect immunocytes and other hemocytes: roles in cellular and humoral immunity / A.P. Gupta // Immunology of insects and other arthropods (Gupta A.P. ed.) – CRC Press. – 1991. – P. 19-118.

Hagstrum, D.W. Host utilization by *Bracon hebetor* / D.W. Hagstrum, B.J. Smittle // Environ. Entomol. – 1978. – V. 7. – P. 596-600.

Hajek, A.E. Interactions between fungal pathogens and insect hosts / A.E. Hajek, R.J. St. Leger // Ann. Rev. Entomol. – 1994. – V. 39. – P. 293-322.

Hammer, T. J., Caterpillars lack a resident gut microbiome. / Hammer, T. J., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Jaffe, S. P., Fierer, N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2017 – V. **114**, –P. 9641-9646

Hansen, A.K. Frequency of secondary symbiont infection in an invasive psyllid relates to parasitism pressure on a geographic scale in California / A.K. Hansen, G. Jeong, T.D. Paine, R. Stouthamer // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – V. 73. – P. 7531-7535.

Hansen, A.K. Genomic basis of endosymbiont-conferred protection against an insect parasitoid / A.K. Hansen, C. Vorburger, N.A. Moran // *Genome Res.* – 2013. – V. 22. – P. 106-114.

Harding, C.R. *Legionella pneumophila* pathogenesis in the *Galleria mellonella* infection model / C.R. Harding, G.N. Schroeder, S. Reynolds, A. Kosta, J.W. Collins, A. Mousnier, G. Frankel // *Infect. Immun.* – 2012. – V. 80. – P. 2780-2790.

Haspel, G. Direct injection of venom by a predatory wasp into cocroach brain / G. Haspel, L.A. Rosenberg, F. Libersat // *Journal of Neurobiology.* – 2003. – V. 56. – № 3. – P. 287-292.

Hayek, A. Attachment and germination of *Entomophaga maimaiga* conidia on host and non-host larval cuticle / A. Hayek, C. Eastburn // Journal of Invertebrate Pathology. – 2003. – V. 82. – № 1. – P. 12-22.

Hesketh, H. Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects / H. Hesketh, H.E. Roy, J. Eilenberg, J.K. Pell, R.S. Hails // BioControl. – 2010. – V. 55. – P. 55-73.

Hochberg, M.E. Competition between kingdoms / M.E. Hochberg, J.H. Lawton // Trends Evol. Ecol. – 1990. – V. 5. – № 11. – P. 367-371.

Hu, G. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent / G. Hu, R.J. St Leger // Appl Environ. Microbiol. – 2002. – V. 68. – № 12. – P. 6383-6387.

Hu, X. Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation / X. Hu, G. Xiao, P. Zheng, Y. Shang, Y. Su, X. Zhang, X. Liu, S. Zhan, R.J. St Leger, Ch. Wang // PNAS. – 2014. – V. 111. – № 47. – P. 16796-16801.

Huarte-Bonnet, C. Alkane-grown *Beauveria bassiana* produce mycelial pellets displaying peroxisome proliferation, oxidative stress, and cell surface alterations / C. Huarte-Bonnet, F.R.S. Paixão, J.C. Ponce, M. Santana, E.D. Prieto, N. Pedrini // Fungal Biol. – 2017 – V. 122. – № 6. – P. 457-464.

Hudon, M. First record of *Perilitus coccinellae* (Schrank) (Hymenoptera: Braconidae) as a parasite of *Coccinella novemnotata* Hbst. and *Coleomegilla macilata legni* Timb. (Coleoptera: Coccinellidae) in Canada / M. Hudon // Canad. Entomol. – 1959. – V. 91. – № 1. – P. 62-63.

Hur, H. Chemical ingredients of *Cordyceps militaris* / H. Hur // Mycobiology. – 2008. – V. 36. – № 4. – P. 233-235.

Iwanaga, S. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals / S. Iwanaga, B.L. Lee // J. Biochem. Mol. Biol. – 2005. – V. 38. – № 2. – P. 128-150.

Jaber, L.R. Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth? / L.R. Jaber, J. Enkerli // Biocontrol Sci. Technol. – 2017. – V. 27. – P. 28-41.

Jaronski, S.T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens / S.T. Jaronski // *BioControl*. – 2010. – V. 55. – P.159-185.

Jarrold, S.L. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle / S.L. Jarrold, D. Moore, U. Potter, A.K. Charnley // *Mycol. Res.* – 2007. – V. 111. – P.240-249.

Johnson, J.H. Insecticidal toxins from *Bracon hebetor* nucleic acid encoding said toxin and methods of use / J.H. Johnson, R.M.Jr. Kral, K. Krapcho // US Patent – 1999. – №. 5,874,298

Johnston, P.R. Gut bacteria are not required for the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* toward the tobacco hornworm, *Manduca sexta* / P.R. Johnston, N. Crickmore // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 75. – P. 5094-5099.

Jones, S.L. Fundamental Immunology S.L. Jones, F.P. Lindberg, / E.J. Brown Phagocytosis // Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. –1999. – 997–1020. p.

Kabaluk, T. *Metarhizium brunneum* - An enzootic wireworm disease and evidence for its suppression by bacterial symbionts / T. Kabaluk, E. Li-Leger, S. Nam // *J. Invertebr. Pathol.* – 2017. – V. 150. – P. 82-87.

Kaltenpoth, M. Defensive microbial symbionts in Hymenoptera / M. Kaltenpoth, T. Engl // *Functional Ecology*. – 2013. – V. 28. – P. 315-327.

Kaneko, Y. Expression of antimicrobial peptide genes encoding enbocin and gloverin isoforms in the silkworm, *Bombyx mori* / Y. Kaneko, S. Furukawa, H. Tanaka, M. Yamakawa // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2007. – V. 71. – P. 2233-2241.

Kepler, R.M. New teleomorph combinations in the entomopathogenic genus *Metacordyceps* / R.M. Kepler, G.-H. Sung, S. Ban, A. Nakagiri, M.-J. Chen, B. Huang, Z. Li, J.W. Spatafora // *Mycologia*. – 2012. – V. 104. – № 1. – P. 182-197.

Kerchev, I.A. Entomoparasitic nematodes *Sychnotylenchus* sp. (Anguinidae) on the four-eyed fir bark beetle *Polygraphus proximus*: Effects on the host's immunity and its susceptibility to *Beauveria bassiana* / I.A. Kerchev, N.A.

Kryukova, V.Yu. Kryukov, V.V. Glupov // *Invertebrate Survival Journal* – 2017. – V 14 – P. 324-329

Keyser, C.A. *Metarhizium* seed treatment mediates fungal dispersal via roots and induces infections in insects / C.A. Keyser, K. Thorup-Kristensen, N.V. Meyling // *Fungal Ecology*. – 2014. – V. 11. – P. 122-131.

Khachatourians, G.G. *Entomopathogenic fungi: biochemistry and molecular biology* / G.G. Khachatourians, S.S. Qazi // *Human and Animal Relationships The Mycota* (Brakhage A.A., Zipfel P.F. ed) – Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. – 2008. – P. 33-61.

King, E.G. Interactions between a braconid, *Microplitis croceipes*, and a fungus, *Nomuraea rileyi*, in laboratory-reared bollworm larvae / E.G. King, J.V. Bell // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1978. – V. 31. – P. 337–340.

Knudsen, G.R. Spatial simulation of epizootics caused by *Beauveria bassiana* in russian wheat aphid populations / G.R. Knudsen, D.J. Schotzko // *Biological Control*. – 1999. – V. 16. – № 3. – P. 318-326.

Kopelke, J.-P. *Adelognathus cubiceps* Roman, 1924 (Ichneumonidae, Adelognathinae) — ein ungewonlicher Parasitoid der gallenbildenden *Pontania*-Arten (Tentredinidae: Nematocinae) (Insecta: Hymenoptera) / J.-P. Kopelke // *Senckerberg. Biol.* – 1987. – V. 67. № 4-6. – P. 253-259.

Krams, I.A. Microbiome symbionts and diet diversity incur costs on the immune system of insect larvae / I.A. Krams, S. Kecko, P. Jöers, G. Trakimas, D. Elferts, R. Krams, S. Luoto, M.J. Rantala, I. Inashkina, D. Gudrā, D. Fridmanis, J. Contreras-Garduño, L. Grantina-Ievina, T. Krama // *J. Exp. Biol.* – 2017. – V. 220. – P. 4204-4212.

Krell, V. Cellulase enhances endophytism of encapsulated *Metarhizium brunneum* in potato plants / V. Krell, D. Jakobs-Schoenwandt, S. Vidal, A.V. Patel // *Fungal Biol.* – 2018. – V. 122. – P. 373-378.

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. Yaroslavtseva, V.V. Glupov // *Insect Science*. – 2017. – P. 1-12 (a).

Kryukov, V.Yu. Temperature adaptations of *Cordyceps militaris*, impact of host thermal biology and immunity on mycosis development / V.Yu. Kryukov, O.G. Tomilova, O.N. Yaroslavtseva, W. Ting-Chi, N.A. Kryukova, O.V. Polenogova, Y.S. Tokarev, V.V. Glupov // *Fungal Ecology*. – 2018. – V. 35. – P. 98-107 (b).

Kryukov, V.Yu. Fungal infection dynamics in response to temperature in the lepidopteran insect *Galleria mellonella* / V.Yu. Kryukov, O.N. Yaroslavtseva, 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 (c).

Kryukov, V.Yu. Effects of fluorine-containing usnic acid and fungus *Beauveria bassiana* on the survival and immune-physiological reactions of Colorado potato beetle larvae. / V.Y. Kryukov, O.G. Tomilova, O.A. Luzina, O.N. Yaroslavtseva, Y.B. Akhanaev, M.V. Tyurin, B.A. Duisembekov, N.F. Salakhutdinov, V.V. Glupov // *Pest Manag Sci*. 2018 V 74 №3 P 598-606.(d)

Kryukov, V.Yu. Local epizootics caused by teleomorphic cordycipitoid fungi (Ascomycota: Hypocreales) in populations of forest lepidopterans and sawflies of the summer-autumn complex in Siberia / V.Yu. Kryukov, O.N. Yaroslavtseva, G.R. Lednev, B.A. Borisov // *Microbiology*. – 2011. – V. 80. – № 2. – P. 286-296.

Kryukov, V.Yu. Susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to anamorphic entomopathogenic ascomycetes under envenomation and parasitization by *Habrobracon hebetor* / V.Yu. Kryukov, N.A. Kryukova, V.V. Glupov // *Russian Journal of Ecology*. – 2013. – V. 44. – P. 89-92.

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

Kryukova, N.A. Venom from the ectoparasitic wasp *Habrobracon hebetor* activates calcium-dependent degradation of *Galleria mellonella* larval hemocytes /

N.A. Kryukova, E.A. Chertkova, A.D. Semenova, Y.I. Glazachev, I.A. Slepneva, V.V. Glupov // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. – 2015. – V. 90. – P. 117-130.

Kurtti, T.J. Intracellular infection of tick cell lines by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* / T.J. Kurtti, N.O. Keyhani // Microbiology. – 2008. – V. 154. – P. 1700-1709.

Lanz-Mendoza, H. Insect Innate Immune Memory / H. Lanz-Mendoza, J.C. Garduño // Advances in Comparative Immunology (Cooper E. ed). – Springer. – 2018. – P. 193-211.

Lavine, M.D. Immune challenge differentially affects transcript abundance of three antimicrobial peptides in hemocytes from the moth *Pseudoplusia includens* / M.D. Lavine, G. Chen, M.R. Strand // Insect Biochem Mol Biol. – 2005. – V. 35. – № 12. – P. 1335-1346.

Leal, S.C.M. Amplification and restriction endonuclease digestion of the Pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains / S.C.M. Leal, D.J. Bertoli, T.M. Butt, J.H. Carder, P.R. Burrows, J.F. Peberdy // Mycol. Res. – 1997. – V. 101. – № 3. – P. 257-265.

Leslie, E.J. The intrinsic rate of natural increase of *Tribolium castaneum* Hbst. / E.J. Leslie, T. Park // Ecology. – 1949. – V. 30. – P. 449-477.

Lord, J.C. Response of the wasp *Cephalonomia tarsalis* (Hymenoptera: Bethyloidea) to *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) as free conidia or infection in its host, the sawtoothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) / J.C. Lord // Biol. Contr. – 2001. – V. 21. – № 3. – P. 300-304.

Lu, H.L. Insect Immunity to Entomopathogenic Fungi / H.L. Lu, R.J. St Leger // Adv Genet. – 2016. – V. 94. – P. 251-285.

Luckhart, S. Interaction of a wasp ovarian protein and polydnavirus in host immune suppression / S. Luckhart, B.A. Webb // Dev. Comp. Immunol. – 1996. – V. 20. – P. 1-21.

Luna, M.G. Encapsulation and Self-Superparasitism of *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae), a Parasitoid of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) / M.G. Luna, N. Desneux, M. Schneider // PLoS One. – 2016. – V. 11. – № 10. – P. e0163196.

Magro, S.R. Biology of the ectoparasitoid *Bracon hebetor* Say on seven lepidopteran species / S.R. Margo, J.R.P. Parra // Scientia Agricola. – 2001. – V. 58. – P. 693-698.

Martemyanov, V.V. Phenological asynchrony between host plant and gypsy moth reduces insect gut microbiota and susceptibility to *Bacillus thuringiensis* / V.V. Martemyanov, I.A. Belousova, S.V. Pavlushin, I.M. Dubovskiy, N.I. Ershov, T.Y. Alikina, M.R. Kabilov, V.V. Glupov // Ecol. Evol. – 2016. – V. 6. – P. 7298-7310.

Mascarin, G.M. First record of epizootics in the ocola skipper, *Panoquina ocola* (Lepidoptera: Hesperiiidae), caused by *Isaria tenuipes* in flooded rice fields of Central Brazil. / G.M. Mascarin, C.A. Dunlap, J.A. Barrigossi, E.D. Quintela, N.C.Jr. de Noronha // J. Appl. Microbiol. – 2017. – V. 122. – № 4. – P. 1020-1028.

Mason, K.L. From Commensal to Pathogen: Translocation of *Enterococcus faecalis* from the midgut to the hemocoel of *Manduca sexta* / K.L. Mason, T.A. Stepien, J.E. Blum, J.F. Holt, N.H. Labbe, J.S. Rush, K.F. Raffa, J. Handelsman // mBio. – 2011. – V. 2. doi: 10.1128/mBio.00065-11.

Maure, F. The cost of a bodyguard / F. Maure, J. Brodeur, N. Ponlet, J. Doyon, A. Firlej, E. Elguero, F. Thomas // Biology Letters. – 2011. – V. 7. – P. 843-846

Maure, F. Host behavior manipulation as an evolutionary route toward attenuation of parasitoid virulence. Journal of Evolutionary / F. Maure, J. Doyon, F. Thomas, J. Brodeur // Biology. – 2014. – V 27 – P 2871 – 2875.

Mbata, G.N. Compatibility of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) / G.N. Mbata, D.I. Shapiro-Ilan // Biological Control. – 2010. – V. 54. – № 2. – P. 75-82.

McKinnon, M.C. What are the effects of nature conservation on human well-being? A systematic map of empirical evidence from developing countries / M.C.

McKinnon, S.H. Cheng, S. Dupre, J. Edmond, R. Garside, L. Glew, M.B. Holland, E. Levine, Y.J. Masuda, D.C. Miller, I. Oliveira, J. Revenaz, D. Roe, S. Shamer, D. Wilkie, S. Wongbusarakum, E. Woodhouse // *Environ Evid.* – 2016. – V. 5 – № 8
<https://doi.org/10.1186/s13750-016-0058-7>

Meisteret, M. The antimicrobial host defense of *Drosophila* / M. Meister, C. Hetru, J.A. Hoffmann // *Du Pasquier, Litman.* – 2000. – V. 248. – P. 17-36.

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 // *J. Invertebr. Pathol.* – 2010. – P. 132-139.

Ment, D. Role of cuticular lipids and water-soluble compounds in tick susceptibility to *Metarhizium* infection / D. Ment, G. Gindin, A. Rot, D. Eshel, P. Teper-Bamnolker, I. Ben-Ze'ev, I. Glazer, M. Samish // *Biocontrol Science and Technology.* – 2013. – V. 23. – P. 956-967.

Mesquita, A.L.M. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), the parasitoid, *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae), and their aphid host / A.L.M. Mesquita, L.A. Lacey // *Biological Control.* – 2001. – V. 22. – P. 51-59.

Moghaddam, M.R. The potential of the *Galleria mellonella* innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides / M.R. Moghaddam, M. Tonk, C. Schreiber, D. Salzig, P. Czermak, A. Vilcinskas, M. Rahnamaeian // *Biol. Chem.* – 2016. – V. 397. – P. 939-945.

Mraeek, Z. The use of “*Galleria* traps” for obtaining nematode parasites of insects in Czechoslovakia (Lepidoptera: Nematoda, Steinernematidae) / Z. Mraeek // *Acta Entomol. Bohemoslov.* – 1980. – V. 77. – P. 378-382.

Mukherjee, K. The entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* communicates with the insect host *Galleria mellonella* during infection / K. Mukherjee, A. Vilcinskas // *Virulence.* – 2018. – V. 9. – № 1. – P. 402-413.

Nakaguchi, A. Compatible invasion of a phylogenetically distant host embryo by a hymenopteran parasitoid embryo / A. Nakaguchi, T. Hiraoka, Y. Endo, K. Iwabuchi // *Cell Tissue Res.* – 2006. – V. 324. – P. 167-173.

Nelson, D.R. External lipids of adults of the giant whitefly, *Aleurodicus dugesii* / D.R. Nelson, C.L. Fatland, J.S. Buckner, T.P. Freeman // *Comp. Biochem. Physiol. B.* – 1999. – V. 123. – P. 137-145.

Neufeld, T.P. Eating on the fly: Function and regulation of autophagy during cell growth, survival and death in *Drosophila* / T.P. Neufeld, E.H. Baehrecke // *Autophagy.* – 2008. – V. 4. – № 5. – P. 557-562.

Nishikawa, H. Sex differences in the protection of host immune systems by a polyembryonic parasitoid / H. Nishikawa, J. Yoshimura, K. Iwabuchi // *Biol Lett.* – 2013. – V. 9. – № 6. – doi: 10.1098/rsbl.2013.0839.

Nouhuys, S. Variation in a Host–Parasitoid Interaction across Independent Populations / S. Nouhuys, S. Niemikapee, I. Hanski // *Insects.* – 2012. – V. 3. – № 4. – P. 1236-1256.

Oliver, K.M. Bacteriophages encode factors required for protection in a symbiotic mutualism / K.M. Oliver, P.H. Degnan, M.S. Hunter, N.A. Moran // *Science.* – 2009. – V. 325. – P. 992-994.

Oliver, K.M. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype / K.M. Oliver, N.A. Moran, M.S. Hunter // *PNAS.* – 2005. – V. 102. – P. 12795-12800.

Oreste, M. Effects of entomopathogenic fungi on *Encarsia formosa* Gahan. (Hymenoptera: Aphelinidae) activity and behavior / M. Oreste, G. Bubici, M. Polisenio, E. Tarasco // *Biological Control.* – 2016. – V. 100. – P. 46-53.

Ownley, B.H. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution / B.H. Ownley, K.D. Gwinn, F.E. Vega // *BioControl.* – 2010. – V. 55. – № 1. – P. 113-128.

Pal, S. Fungal peptide destruxinA plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster* / S. Pal, R.J. St Leger, L.P. Wu // *J. Biol.Chem.* – 2007. – V. 282. – P. 8969-8977.

Park, J. Benzylideneacetone suppresses both cellular and humoral immune responses of *Spodoptera exigua* and enhances fungal pathogenicity / J. Park, Y. Kim // *J. Asia–Pacific Entomol.* – 2011. – V. 14. – P. 423-427.

Pedrini, N. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi / N. Pedrini, R. Crespo, M.P. Juarez // *Comp Biochem Physiol.* – 2007. – V. 146. – P. 124-137.

Pedrini, N. Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. / N. Pedrini // *Fungal Biol.* – 2018 – V. 122 – №6 – P 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.10.003>.

Peng, G.X. Field trials of *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* (Ascomycota: Hypocreales) against oriental migratory locusts, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) in Northern China / G.X. Peng, Z.K. Wang, Y.P. Yin, D.Y. Zeng, Y.X. Xia // *Crop Prot.* – 2008. – V. 27. – P. 1244-1250.

Pennacchio, F. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera / F. Pennacchio, M.R. Strand // *Annu. Rev. Entomol.* – 2006. – V. 51. – P. 233-258.

Piek, T. The effect of the venom of *Microbracon hebetor* (Say) on the hyperpolarizing potentials in a skeletal muscle of *Philosamia cynthia* Htibn / T. Piek, P. Mantel // *Comp. Gen. Pharmac.* – 1970. – P. 87-92.

Polovinko, G.P. Dominating species of entomophilous ascomycetes anamorphs in West Siberia, Primorsky Krai, and Kyrgyzstan / G.P. Polovinko, O.N. Yaroslavtseva, Z.A. Teshebaeva, V.Yu. Kryukov // *Contemporary Problems of Ecology.* – 2010. – V. 3. – № 5. – P. 515-521.

Powell, W. Interference between parasitoids (Hym.: Aphidiidae) and fungi (Entomophthorales) attacking cereal aphids / W. Powell, N. Wilding, P.J. Brobyn, S.J. Clark // *Entomophaga.* – 1986. – V. 31. – № 3. – P. 293-302.

Quistad, G.B. Purification and characterization of insecticidal toxins from venom glands of the parasitic wasp, *Bracon hebetor* / G.B. Quistad, Q. Nguyen, P. Bernasconi, D.J. Leisy // *Insect Biochem. Mol.* – 1994. – V. 24. – P. 955-961.

Rangel, D.E. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins / D.E. Rangel, G.U. Braga, A.J.

Anderson, D.W. Roberts // J. Invertebr. Pathol. – 2005. – V. 88. – № 2. – P. 116-125.

Rännbäck, L.M. Mortality risk from entomopathogenic fungi affects oviposition behavior in the parasitoid wasp *Trybliographa rapae* / L.M. Rännbäck, B. Cotes, P. Anderson, B. Rämert, N.V. Meyling // Journal of Invertebrate Pathology. – 2015. – V. 124. – P. 78-86.

Rantala, M.J. Inbreeding and extreme outbreeding cause sex differences in immune defence and life history traits in *Epirrita autumnata* / M.J. Rantala, D.A. Roff // Send to Heredity (Edinb). – 2007. – V. 98. – № 5. – P. 329-336.

Rashki, M. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales), the parasitoid, *Aphidius matricariae* (Hymenoptera: Braconidae), and its host, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) Original Research Article / M. Rashki, A. Kharazi-pakdel, H. Allahyari, J.J.M. Alphen // Biological Control. – 2009. – V. 50. – № 3. – P. 324-328.

Ratcliffe, N.A. Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: clearance of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* / N.A. Ratcliffe, J.B. Walters // Journal of Insect Physiology. – 1983. – V. 29. – P. 407-415.

Richards, E.H. Recombinant immunosuppressive protein from *Pimpla hypochondrica* venom (rVPr1) increases the susceptibility of *Mamestra brassicae* larvae to the fungal biological control agent, *Beauveria bassiana* / E.H. Richards, H. Bradish, M.P. Dani, S. Pietravalle, A. Lawson // Arch. Insect. Biochem. Physiol. – 2011. – V. 78. – № 3. – P. 119-131.

Richards, O.W. A contribution to the study of the genera *Epesthia*, Gn. (including *Strymax*, Dyar) and *Plodia*, Gn. (Lepidoptera: Phycitidae) with notes on parasite of the larvae / O.W. Richards, W.S. Thomson // Transactions of the Royal Entomological Society of London. – 1932. – V. 80. – P. 169-250.

Ríos-Moreno, A. Quantification of fungal growth and destruxin A during infection of *Galleria mellonella* larvae by *Metarhizium brunneum* / A. Ríos-Moreno, I. Garrido-Jurado, M.C. Raya-Ortega, E. Quesada-Moraga // Journal of Invertebrate Pathology. – 2017. – V. 149. – P. 9-35.

Rivers, D.B., Localization of intracellular calcium release in cell injured by venom from the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) and dependence of calcium mobilization on G-protein activation./ Rivers D.B., Crawley T., Bauser H. 2005 // Journal of Insect Physiology. – 2005 – V. 51 – P. 149—160.

Robertson, J.L. Pesticide Bioassays with Arthropods / J.L. Robertson, H.K. Preisler // CRC. Boca Raton. FL. – 1992.

Roy, H.E. Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: implications for biological control / H.E. Roy, J.K. Pell // Biocontr. Sci. Techn. – 2000. – V. 10. – № 6. – P. 737-752.

Sandhu, S.S. Myco–biocontrol of insect pests: factors involved, mechanism, and regulation / S.S. Sandhu, A.K. Sharma, V. Beniwal, G. Goel, P. Batra, A. Kumar, S. Jaglan, A.K. Sharma, S. Malhotra // Journal of Pathogens. – 2012. – P. 1-10.

Sato, H. Stromata production for *Cordyceps militaris* (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative host insects / H. Sato, M. Shimazu // Appl. Entomol. Zool. – 2002. – V. 37. – № 1. – P. 85-92.

Schmidt, O. Innate immunity and evasion by insect parasitoids / O. Schmidt, U. Theopold, M.R. Strand // BioEssays. – 2001. – V. 23. – P. 344-351.

Scheirer, C.J. The analysis of ranked data derived from completely randomized factorial designs. / Scheirer C.J., Ray W.S., Hare N. //Biometrics. 1976 Jun; – V. 32. – № 2: – P. 429-34.

Shaw, M.R. Classification and biology of braconid wasps (Hymenoptera: Braconidae)/ M.R. Shaw, T. Huddleston // Royal Entomological Society of London, London. – 1991. – 1-126. p.

Sheepmaker, J.W.A. Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations / J.W.A. Scheepmaker, T.M. Butt // Biocontr. Sci. Tech. – 2010. – V. 20. – № 5. – P. 503-552.

Siddiqui, B.S. Insecticidal amides from fruits of *Piper Nigrum* Linn. / B.S. Siddiqui, T. Gulzar, S. Begum, F. Afshan, F.A. Sattar // *Natural Product Letters*. – 2005. – V. 19. – № 2. – P. 143-150.

Sivakumar, G. Characterization and role of gut bacterium *Bacillus pumilus* on nutrition and defense of leafhopper (*Amrasca biguttula biguttula*) of cotton / G. Sivakumar, R. Rangeshwaran, M.S. Yandigeri, M. Mohan, T. Venkatesan, C.R. Ballal, B. Ramanujam, S. Yalashetti, S. Kumari, A. Verghese // *Indian J. Agr. Sci.* – 2017. – V. 87. – P. 534-539.

Smith, L.E. Mechanism for lysozyme-catalyzed hydrolysis / L.E. Smith, L.H. Mohr, M.A. Raftery // *J. Am. Chem. Soc.* – 1973. – V. 95. – № 22. – P. 7497-7500.

Smith, R.J. Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana* / R.J. Smith, E.A. Grula // *J. Invertebr. Pathol.* – 1982. – V. 39. – № 1. – P. 15-22.

Soderhall, K. Effect of quinones and melanin on mycelial growth of *Aphanomyces* spp., and extracellular protease of *Aphanomyces astaci*, a parasite on crayfish / K. Soderhall, R. Ajaxon // *J. Invertebr. Pathol.* – 1982. – V. 39. – P. 105-109.

Sosa-Gomez, D.R. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes / D.R. Sosa-Gomez, D.G. Boucias, J.L. Nation // *J. Invertebr. Pathol.* – 1997 – V. 69. – № 1. – P. 31-39.

St Leger, R.J. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects / R.J. St Leger // *Can. J. Bot.* – 1995. – V. 73. – P. 1119-1125.

Strand, M.R., Immunological basis for compatibility in parasitoid–host relationships / M.R. Strand, L.L. Pech // *Annu. Rev. Entomol.* – 1995. – V. 40. – P. 31-56.

Strand, M.R. Superparasitism and ovicide in parasitic Hymenoptera: theory and a case study of the ectoparasitoid *Bracon hebetor* / M.R. Strand, H.C.J. Godfray // *Behav. Ecol. Sociobiol.* – 1989. – V. 24. – P. 421-432.

Sung, G.H. Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi / G.H. Sung, N. L. Hywel-Jones, J.M. Sung, J. J. Luangsa-ard, B. Shrestha, J. W. Spatafora // Stud. Mycol. –2007; –V. 57: – P. 1-63. doi: 10.3114/sim.2007.57.01

Takahashi-Nakaguchi, A. An ultrastructural study of polyembryonic parasitoid embryo and host embryo cell interactions / A. Takahashi-Nakaguchi, T. Hiraoka, K. Iwabuchi // J. Morphol. – 2010. – V. 271. P. 750-758.

Takahashi-Nakaguchi, A. The carbohydrate ligands on the host embryo mediate intercellular migration of the parasitic wasp embryo / A. Takahashi-Nakaguchi, T. Hiraoka, K. Iwabuchi // FEBS Lett. – 2011. – V. 585. – P. 2295-2299.

Tamashiro, M. A biological study of the venoms of two species of Bracon / M. Tamashiro // Hawaii Agric. Exp. Stn Tech. Bull. – 1971. – V. 70. – P. 1-52.

Taylor, A.D. Host effects on functional and ovipositional responses of *Bracon hebetor* / A.D. Taylor // J. Anim. Ecol. – 1988. – V. 57. – P. 173-184.

Thomas, M.B. Can fungal biopesticides control malaria? / M.B. Thomas, A.F. Read // Nature Reviews Microbiology. – 2007. – V. 5. – № 5. – P. 377-383.

Thomsen, L. Time-concentration mortality of *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) and *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae from different destruxins / L. Thomsen, J. Eilenberg // Environ. Entomol. – 2000. – V. 29. – № 5. – P. 1041-1047.B

Tomilova, O.G. Immune-physiological aspects of synergy between avermectins and the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* in Colorado potato beetle larvae / O.G. Tomilova, V.Yu. Kryukov, B.A. Duisembekov, O.N. Yaroslavtseva, M.V. Tyurin, N.A. Kryukova, V. Skorokhod, I.M. Dubovskiy, V.V. Glupov // Journal of Invertebrate Pathology. – 2016. – V. 140. – P. 8-15.

Uma Devi, K. Susceptibility to fungi of cotton boll worms before and after a natural epizootic of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes) / K. Uma Devi, C.H. Murali Mohan, J. Padmavathi, K. Ramesh // Biocontrol Science and Technology. – 2003. – V. 13. – P. 367-371.

Vazquez, M.J. A new destruxin as inhibitor of vacuolar-type H⁺- ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* / M.J. Vazquez, M.I. Albarran, A. Espada, A. Rivera-

Saavedra, E. Diez, J.A. Hueso-Rodriguez // Chem. Biodivers. – 2005. – V. 2. – P. 123-130.

Vega, F.E. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control a review / F.E. Vega // Mycologia. – 2018. – V. 110. – № 1. – P 4-30.

Visser, B.J. Characterization of two paralyzing protein toxins (A-MTX and B-MTX), isolated from a homogenate of the wasp, *Microbracon hebetor* (Say) / B.J. Visser, W.T. Labruyere, W. Spanjer, T. Piek // Comp. Biochem. Physiol. – 1983. – V. 75B. – P. 523-530.

Visser, B.J. Isolation and some biochemical properties of a paralyzing toxin from the venom of the wasp *Microbracon hebetor* (Say) / B.J. Visser, W. Spanjer, H. de Klonia, T. Piek, C. van der Meer, A.C.M. van der Drift // Toxicon. – 1976. – V. 14. – P. 357-370.

Vorburger, C. A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids / C. Vorburger, L. Gehrler, P. Rodriguez // Biol Lett. – 2010. – V. 6. – № 1. – P. 109-111.

Wang, B. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. / Wang, B., Kang, Q., Lu, Y., Bai, L., Wang, C., // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012 – V. 109 – №4 – P 1287-1292.

Wang, C. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses / C. Wang, R.J. St Leger // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – V. 103. – № 17. P. 6647-6652.

Wang, C. Detection and characterization of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* / C. Wang, M.A. Typas, T.M. Butt // FEMS Microbiology Letters. – 2002. – V. 213. – № 2. – P. 251-255.

Wang, S. Comparative genomics using microarrays reveals divergence and loss of virulence-associated genes in host-specific strains of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* / S. Wang, A. Leclerque, M. Pava-Ripoll, W. Fang, R.J. St Leger // Eukaryotic Cell. – 2009. – V. 8. – № 6. – P. 888-898.

Wei, G. Insect pathogenic fungus interacts with the gut microbiota to accelerate mosquito mortality / G. Wei, Y. Lai, G. Wang, H. Chen, F. Li, S. Wang // Proc Natl Acad Sci USA. – 2017. – V. 114. – № 23. – P. 5994-5999.

Weiss, K., Multifaceted defense against antagonistic microbes in developing offspring of the parasitoid wasp *Ampulex compressa* (Hymenoptera, Ampulicidae). / K. Weiss, C. Parzefall, G. Herzner // PLoS ONE, – 2014 9:e98784. doi:10.1371/journal.pone.0098784

Wilson, K. Melanism and disease resistance in insects / K. Wilson, S.C. Cotter, A.F. Reeson, J.K. Pell // Ecol. Lett. – 2001. – V. 4. – № 6. – P. 637-649.

Wojda, I. Heat shock affects host–pathogen interaction in *Galleria mellonella* infected with *Bacillus thuringiensis* / I. Wojda, P. Taszlow // J. Insect Physiol. – 2013. – V. 59. – P. 894-905.

Wojda, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella* / I. Wojda // J. Insect Sci. – 2017. – V. 24. – P. 342-357.

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 // J. Invertebr. Pathol. – 2005. – V. 90. – № 3. – P. 139-150.

Wu, Q. Insect antimicrobial peptides, a mini review / Q. Wu, J. Patocka, K. Kuca // Toxins (Basel). – 2018. – V. 10. – № 11. – P. 461.

Wu, Y. Isolation, detection toxicity and structure of toxin from *Beauveria bassiana* / Y. Wu, X. Huang, J. Deng, J. Hong // Wei Sheng Wu Xue Bao. – 1998. – V. 38. – № 6. – P. 468-474.

Wyrebek, M. Variability in the Insect and Plant Adhesins, Mad1 and Mad2, within the Fungal Genus *Metarhizium* Suggest Plant Adaptation as an Evolutionary Force / M. Wyrebek, M.J. Bidochka // PLoS ONE. – 2013. – V. 8. – № 3. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059357>

Xie, J. J. Effect of the *Drosophila* endosymbiont *Spiroplasma* on parasitoid wasp development and on the reproductive fitness of wasp-attacked fly survivors /

Xie, B. Tiner, I. Vilchez, M. Mateos // *Evol Ecol.* – 2011. – V. 53. – № 5. – P. 1065-1079.

Yaroslavtseva, O.N. Immunological mechanisms of synergy between fungus *Metarhizium robertsii* and bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* on Colorado potato beetle larvae / O.N. Yaroslavtseva, I.M. Dubovskiy, V.P. Khodyrev, B.A. Duisembekov, V.Yu. Kryukov, V.V. Glupov // *J Insect Physiol.* – 2017. – V. 96. – P. 14-20.

Yeung, T. Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis / T. Yeung, B. Ozdamar, P. Paroutis, S. Grinstein // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2006. – V. 18. – № 4. – P. 429-437.

Zhang, F. The interactions between gut microbiota and entomopathogenic fungi: a potential approach for biological control of *Blattella germanica* (L.) / F. Zhang, X.X. Sun, X.C. Zhang, S. Zhang, J. Lu, Y.M. Xia, Y.H. Huang, X.J. Wang // *Pest Manag Sci.* – 2018. – V. 74. – № 2. – P. 438-447.

Zhang, Y. *Ophiocordyceps sinensis*, the flagship fungus of China: terminology, life strategy and ecology / Y. Zhang, E. Li, C. Wang, Y. Li, X. Liu // *Mycology.* – 2012. – V. 3. – № 1. – P. 2-10.

Zhang, J. Prophenoloxidase-mediated Ex Vivo immunity to delay fungal infection after insect ecdysis. / J. Zhang, W. Huang, C. Yuan, Y Lu, B. Yang, C.-Y. Wang, P. Zhang, L. Dobens, Z. Zou, C. Wang, E. Ling // *Front. Immunol.* – 2017. – V 8, – P 1445. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01445>.

Zhang, Y.J. Phylogeography and evolution of a fungal–insect association on the Tibetan Plateau / Y.J. Zhang, S. Zhang, Y.L. Li, S.L. Ma, C.S. Wang, M.C. Xiang, X. Liu, Z.Q. An, J. Xu, X.Z. Liu // *Mol Ecol.* – 2014. – V. 23. – P. 5337–5355.

Zikic, V. Checklist of the genus *Bracon* (Hymenoptera: Braconidae) in Serbia / V. Zikic, S.S. Stankovic, M. Ilic // *Biologica Nissana.* – 2012. – V. 3. – P. 21-29.

Zimmermann, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* / G. Zimmermann // *Biocontr. Sci. Tech.* – 2007. – V. 17. – № 9. – P. 879-920.

ПРИЛОЖЕНИЕ

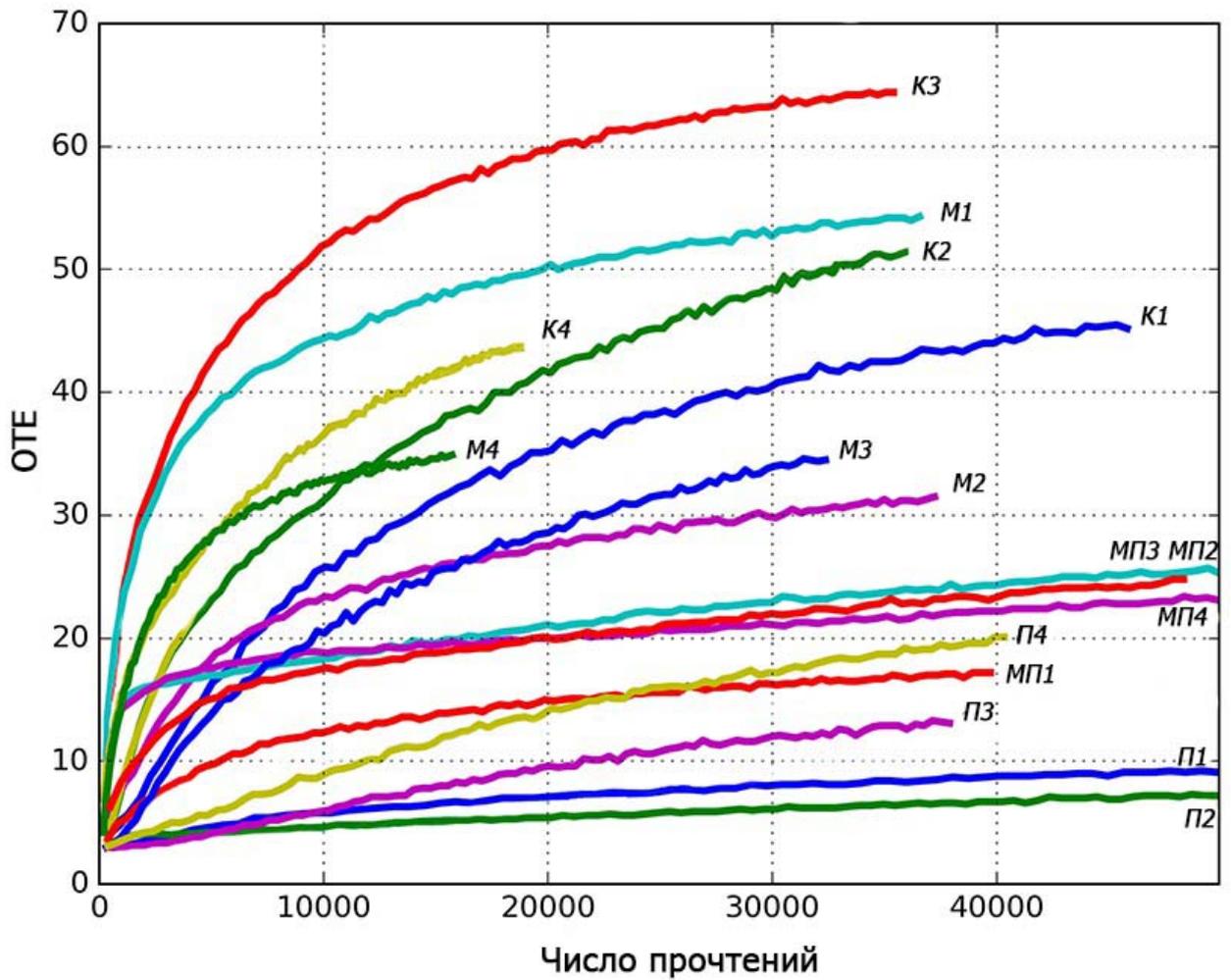


Рисунок 18. Динамика накопления количества ОТЕ в зависимости от числа прочтений для образцов кишечников воцинной огневки при обработке насекомых грибами, парализации ядом *N. hebetor* и действии обоих факторов. К - контроль; М – микоз; Е – парализация; ЕМ – микоз и парализация; 1, 2, 3, 4 – повторности.



Рисунок 19. Поверхностный рост в области нанесения суспензии конидий *L. muscarium* (А,Б) и аскоспор *Cordyceps militaris* (В,Г) на парализованных ядом *H. hebetor* гусеницах *G. mellonella*.



Рисунок 20. Поверхностный рост *F. oxysporum* на кутикуле парализованных личинок *G. mellonella*.

Таблица 2. Передача *B. bassiana* среди личинок *Uromomeuta evonymella* L. и *Tyria jacobaeae* L. посредством паразитоида (описание методики ниже).

	Уровень парализации, %	% случаев трансмиссии гриба паразитоидом, %	% зараженных от общего числа парализованных личинок	n/n*
<i>Uromomeuta evonymella</i>				
Перенос гриба от зараженных паразитоидов	59.2 ± 14.3	65.0	32.7 ± 3.2	18/267
Контроль (без инокуляции грибом)	65.8 ± 27.3	0.0	0	4/60
Перенос гриба от зараженных личинок к здоровым посредством паразитоида	67.7 ± 9.2	55.6	33.7 ± 8.9	9/133
Контроль (без инокуляции)	26.7 ± 7.6	16.7	1.0 ± 1.0	4/60
<i>Tyria jacobaeae</i>				
Перенос гриба от зараженных личинок к здоровым посредством паразитоида	23.3 ± 32.6	33.3	13.5 ± 5.2	6/60
Контроль (без инокуляции)	10.0 ± 13.6	0	0	5/50

*- число садков/число личинок хозяев

В работе использована методика исследования горизонтального переноса, описанная в разделе 2.4. с небольшими модификациями. Личинок *Uromomeuta evonymella* содержали в вентилируемых банках объемом 500 мл (15 личинок на одну банку). В качестве корма служили листья черемухи из мест обитания фитофага. Личинок *T. jacobaeae* содержали в вентилируемых пластиковых контейнерах объемом 250 мл (10 личинок на контейнер) в качестве корма использовали якобею обыкновенную.

Таблица. 3 Ожидаемая и наблюдаемая смертность личинок восковой моли после обработки *B. bassiana* (Bb) и скармливания культивируемых бактерий среднего кишечника.

	День после обработки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bb и Entrococcus										
Ожидаемая смертность, %	0	1.39	7.65	15.3	20.7	35	38.1	42.1	47.4	52.1
Наблюдаемая смертность, %	0.67	1.33	24.1	35.4	42.7	54.7	66.2	67.8	73.5	77.3
Наблюдаемая - ожидаемая	0.67	-0.1	16.4	20.1	22	19.8	28.1	25.7	26.1	25.2
χ^2	–	0	58.6*	48	45.3	26.4	51.7	41.6	42.2	39.1
Bb и Entrobacter										
Ожидаемая смертность, %	0	1.39	7.65	15.3	20.7	35	38.1	42.1	47.4	52.1
Наблюдаемая смертность, %	0	0	20.7	32.5	39.8	53.3	64	68.8	70.9	75.2
Наблюдаемая - ожидаемая	0	-1.4	13.1	17.1	19.1	18.3	25.9	26.6	23.5	23
χ^2	–	2.42	41.7	38.9	38	25.3	49.1	50.1	38.1	36.6
Bb и Serratia										
Ожидаемая смертность, %	0	0.63	6.09	14.9	20.3	33.8	36.9	42.1	47.3	51.4
Наблюдаемая смертность, %	0	0	19.9	28.8	43.1	66.8	74.7	77.1	81.2	83
Наблюдаемая - ожидаемая	0	-0.6	13.8	14	22.9	33.1	37.8	35	33.9	31.7
χ^2	–	1.12	59.2	27.4	57.5	87	109	89.6	82.2	71.5

* - Значения, выделенные жирным шрифтом показывают существенный синергетический эффект ($\chi^2 > 3.84$, $df = 1$, $P < 0.05$) рассчитанный, как описано Дж. Л. Робертсоном и Н. К. Прейслером (Robertson and Preisler, 1992).