

**Активность ферментов детоксицирующей системы и реакций
клеточного иммунитета личинок колорадского жука
Leptinotarsa decemlineata (Say) при смешанной инфекции,
вызванной грибами *Metarhizium anisopliae* и бактериями
Bacillus thuringiensis ssp. *morrisoni* var. *tenebrionis***

О.Н. Ярославцева, И.М. Дубовский, В.Ю. Крюков, В.В. Глупов

**Activity of detoxication enzymes and cellular immunity
of the *Leptinotarsa decemlineata* (Say) larvae during the combined
infection by the fungi *Metarhizium anisopliae* and the bacteria
Bacillus thuringiensis ssp. *morrisoni* var. *tenebrionis***

O.N. Yaroslavtseva, I.M. Dubovskiy, V.Yu. Kryukov, V.V. Glupov

Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения РАН, Новосибирск 630091, Россия.

Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630091, Russia. E-mail: yarosl@inbox.ru

Резюме. Проведен анализ активности неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз, а также интенсивности процессов инкапсуляции у личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Say) при совместном заражении энтомопатогенными грибами *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin и бактериями *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* Bonnifoi et de Barjak var. *tenebrionis* Krieg et al. При данной смешанной инфекции установлен синергетический эффект в повышении смертности насекомых. В начальный период микоза зарегистрировано удвоение активности неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз (ГСТ) в гемолимфе личинок колорадского жука. На пятые сутки после заражения грибами отмечено снижение активности данных ферментов в жировом теле и лимфе насекомых. При бактериозе и смешанной инфекции происходило снижение интенсивности инкапсуляции, а также активности детоксицирующих ферментов в жировом теле и лимфе (в 1.5 раза по сравнению с контролем). Подавление защитных систем насекомых при бактериозе, по-видимому, увеличивает их восприимчивость к грибной инфекции, что, в свою очередь, может являться одной из причин эффекта синергизма при смешанных бактериально-грибных патогенезах.

Ключевые слова. *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis*, *Leptinotarsa decemlineata*, смешанные инфекции, синергизм, неспецифические эстеразы, глутатион-S-трансферазы, инкапсуляция.

Abstract. The synergistic effect in the death rate of *Leptinotarsa decemlineata* under co-infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and bacterium *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* Bonnifoi et de Barjak var. *tenebrionis* Krieg et al. was observed. We found the two-fold increase in the detoxification enzyme system activity in the Colorado potato beetle hemolymph during the

initial stage of mycosis. The activity of the detoxification enzymes in the fat body and hemolymph of the insects was decreased on the fifth day of the experiment after inoculating by the fungus. A decrease in encapsulation response of the insects under infection by bacteria and mixed infection has been shown. Moreover, the detoxification enzymes activity in the fat body and hemolymph of these variants was found to be 2/3 of that in the control group. The suppression of the insect's defense systems by bacteria probably explains the synergism observed under the mixed infection.

Key words. *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis*, *Leptinotarsa decemlineata*, co-infection, synergistic action, esterases, glutathione-S-transferase, encapsulation.

Введение

Одной из перспективных групп микроорганизмов для регуляции численности колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Say) являются энтомопатогенные аскомицеты (Martin et al., 2000; Wraight, Ramos, 2002). Однако для препаратов на основе данной группы патогенов характерна нестабильность действия (Lacey, Kaaya, 2007; Крюков и др., 2007), что, в свою очередь, требует поиска синергистов энтомопатогенных грибов. Известно, что эффект синергизма проявляется при заражении насекомых патогенами из различных систематических групп. Например, рядом авторов установлен синергизм в смертности насекомых при сочетании разных видов грибов из родов *Beauveria* и *Isaria* (Bajan, Kmitowa, 1972; Bajan, 1973). Известны работы по сочетанию грибных и бактериальных агентов, дающих синергистический эффект. В частности, данный эффект получен при совместной обработке энтомопатогенными грибами родов *Beauveria* и *Metarhizium* и бактериями *B. thuringiensis* на кукурузном мотыльке *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lewis, Bing, 1991), *Musca domestica* L. (Mwamburi et al., 2009), разных видах саранчовых (Леднев и др., 2007; Крюков и др., 2007). Совместное применение грибных и бактериальных патогенов против колорадского жука также предложено рядом авторов (Costa et al., 2001; Wraight, Ramos, 2005; Крюков и др., 2009).

В основном большинство исследований смешанных бактериально-грибных инфекций было направлено на поиск путей повышения биологической активности препаратов (Lewis, Bing, 1991; Леднев и др., 2007; Крюков и др., 2007). Однако существуют отдельные работы по изучению причин синергизма при смешанных инфекциях. Так, установлено, что под действием бактериальных агентов у насекомых ухудшается питание, замедляются процессы роста и линьки, что может способствовать проникновению гифальных тел гриба в гемоцель хозяина (Wraight, Ramos, 2005; Крюков и др., 2009). При этом почти не обсуждаются биохимические и физиологические причины синергизма.

Существует множество исследований по ответным реакциям насекомых при моноинфекциях. Например, в ответ на проникновение грибных патогенов у насекомых запускается ряд защитных механизмов. К ним относятся клеточный иммунитет, направленный на защиту от проникших пропагул гриба (Griesch, Vilcinskis, 1998), фенолоксидазный каскад (Schwarzenbach, Ward, 2007), антимикробные белки (Gillespie et al., 2000), ферменты, участвующие в детоксикации и инактивации метаболитов гриба [неспецифические эстеразы, глутатион-S-трансферазы (ГСТ) и монооксигеназы] (Серебров и др. 2006; Zibaee et al., 2009). При бактериальных моноинфекциях (в частности вызываемыми бактериями *B. thuringiensis*) в организме насекомых происходит активация гуморальных иммунных систем (активность фенолоксидаз, антимикробные белки) и клеточного иммунитета (фагоцитоз, инкапсуляция, гранулообразование) (Глупов, 2001; Rahman et al., 2004; Dubovskiy et al., 2008a). Также было показано, что при кишечной бактериальной инфекции под действием *B. thuringiensis* происходит увеличение активности компонентов антиоксидантной и детоксицирующей системы в кишечнике личинок *Galleria melonella* L. (Dubovskiy et al., 2008b), однако исследований защитных систем насекомых при смешанных бактериально-грибных инфекциях не проводилось.

В связи с этим целью данной работы стала оценка интенсивности реакции инкапсуляции и активности ферментов детоксицирующей системы (неспецифических эстераз, глутатион-S-трансфераз) при развитии смешанной инфекции, вызванной грибами *Metarhizium anisopliae* и бактериями *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* var. *tenebrionis* на личинках колорадского жука.

Материал и методика

Насекомые. Личинки колорадского жука были собраны на полях картофеля *Solanum tuberosum* L. в Новосибирской области в местах, свободных от применения химических инсектицидов и биопрепаратов. Насекомых содержали в лабораторных условиях при 25° С в вентилируемых пластиковых контейнерах (57 × 39 × 42 см), причем смену корма (листьев картофеля) проводили ежедневно.

Грибы и бактерии. Для инфицирования насекомых использовали штаммы энтомопатогенных микроорганизмов из коллекции Института систематики и экологии животных (ИСиЭЖ СО РАН). Штамм P-72 гриба *Metarhizium anisopliae* был изолирован из колорадского жука (Serebrov et al., 2007). Штамм (H8ab) *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* var. *thuringiensis* изолирован из мучного хрущака (*Tenebrio molitor* L.) лабораторной популяции ИСиЭЖ СО РАН. Конидиальную массу грибов, используемую для заражения насекомых, нарабатывали на дважды автоклавируемом пшенице (Крюков и др., 2009). Бактерии нарабатывали на мясо-пептонном агаре (МПА) в течение 6 суток, затем смывали дистиллированной водой. Титр конидий грибов и кристаллов бактерий определяли с помощью камеры Горяева.

Заражение энтомопатогенами. Для заражения использовали личинок колорадского жука 4-го возраста. Инфицирование проводили путем окунания личинок в водную суспензию конидий гриба (7×10^5 конидий/мл) и споро-кристаллической смеси бактерии (1×10^6 кристаллов/мл) при времени экспозиции 10 с. Побеги и листья картофеля обрабатывали суспензией микроорганизмов ручным опрыскивателем до появления стекающих капель с последующим их высушиванием в течение 20 мин при 25° С. В контрольных вариантах насекомых и растения обрабатывали водой. Учет смертности проводили ежедневно. Измерение активности ферментов детоксицирующей системы и показателей клеточного иммунитета проводили на 1-е и 5-е сутки после заражения.

Измерение интенсивности инкапсуляции. Интенсивность процессов инкапсуляции оценивали по степени потемнения нейлоновых имплантантов (длиной 2.0 мм, диаметром 0.5 мм). Имплантанты вводили под кутикулу насекомых с вентральной стороны, через 4 ч извлекали, фотографировали и измеряли степень потемнения с помощью программы Image Pro (Dubovskiy et al., 2008a).

Приготовление образцов жирового тела и лимфы. Образцы жирового тела и лимфы личинок отбирали в 0.1 М Na-фосфатный буфер (рН 7.2), для предотвращения меланизации добавляли фенилтиомочевину (4 мкг/мл). Образцы жирового тела гомогенизировали при помощи ультразвукового гомогенизатора, затем их центрифугировали при 4° С в течение 5 мин при 500 g для лимфы и 10 мин при 10 000 g для жирового тела. Полученный супернатант использовали для измерения активности детоксицирующих ферментов и количества белка.

Измерение активности неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз. Измерение активности неспецифических эстераз проводили по методу Прабхакаран и Кэмбл (Prabhakaran, Kamble, 1995) с изменениями. К 5 мкл образца жирового тела добавляли 200 мкл р-нитрофенилацетата и инкубировали 5 мин при 28° С. Для измерения активности в гемолимфе к 5 мкл образца также добавляли 200 мкл р-нитрофенилацетата и инкубировали 25 мин при 28° С. Активность неспецифических эстераз определяли по образованию нитрофенила спектрофотометрически при длине волны 410 нм.

Измерение активности глутатион-S-трансфераз проводили по методу Хабига с соавторами (Habig et al., 1974) с изменениями. К 10 мкл образца лимфы или жирового тела добавляли 200 мкл 1 мМ глутатиона и 5 мкл 1мМ ДНХБ, инкубировали при 28° С 20 мин. Активность ГСТ определяли спектрофотометрически по образованию 5-(2.4-динитрофенил)-глутатиона при длине волны 340 нм.

Активность ферментов выражали в единицах изменения оптической плотности (ΔA) инкубационной смеси в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка.

Определение концентрации белка. Концентрацию белка в жировом теле насекомых определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Статистическая обработка данных. Данные по выживаемости насекомых проанализированы методом Каплана-Мейера. Данные по активности ферментов и интенсивности инкапсуляции проанализированы с помощью дисперсионного анализа (Factorial ANOVA), достоверность отличий определяли с помощью критерия Фишера. Значения на графиках представлены в виде средних арифметических и их ошибок (SE). Расчеты выполнены с использованием пакетов STATISTICA 6.0, Sigma-Stat 3.

Результаты и обсуждение

При совместном заражении двумя патогенами *B. thuringiensis* и *M. anisopliae* был получен синергетический эффект в смертности насекомых. Так, при смешанной инфекции время гибели 50 % насекомых (LT_{50}) составило 8 ± 0.5 суток, а к концу эксперимента смертность достигла 90 ± 6 %. При заражении насекомых только бактериями *B. thuringiensis* смертность достоверно не отличалась от контроля на протяжении всего эксперимента (11–16 %). В грибной моноинфекции начало смертности было зарегистрировано с 9-х суток эксперимента, хотя меланистические пятна на кутикуле отмечены уже со 2-х суток после заражения. При инфицировании грибом 50 %-ное время выживания составило 12 ± 0.7 суток, а итоговая смертность – 60 ± 10 % (рис. 1).

Нами было зарегистрировано, что уже на первые сутки происходит 1.5–2-кратное достоверное ($p > 0.01$; $n = 30$; $df 49$) снижение интенсивности инкапсуляции в вариантах с монозаражением бактерией и смешанной инфекцией по сравнению с контрольным вариантом. Развитие микоза не приводило к изменениям интенсивности инкапсуляции (рис. 2).

При изучении активности детоксицирующих ферментов на первые сутки микоза наблюдалась активация неспецифических эстераз и ГСТ в гемолимфе насекомых в 1.6–1.9 раза по сравнению с другими вариантами (рис. 3 и 4). Однако как при бактериальной, так и при смешанной инфекции повышения уровня эстераз не наблюдалось. На 5-е сутки эксперимента происходило снижение активности неспецифических эстераз в лимфе личинок во всех вариантах по сравнению с контролем в 1.5 раза (см. рис. 3). Достоверные различия между вариантами в активности ГСТ на 5-е сутки опыта не зарегистрированы (см. рис. 4). В жировом теле на 1-е сутки эксперимента происходило снижение активности неспецифических эстераз и ГСТ в вариантах с обработкой бактериями в 1.5–2 раза по сравнению с контролем, однако при грибной моноинфекции активность

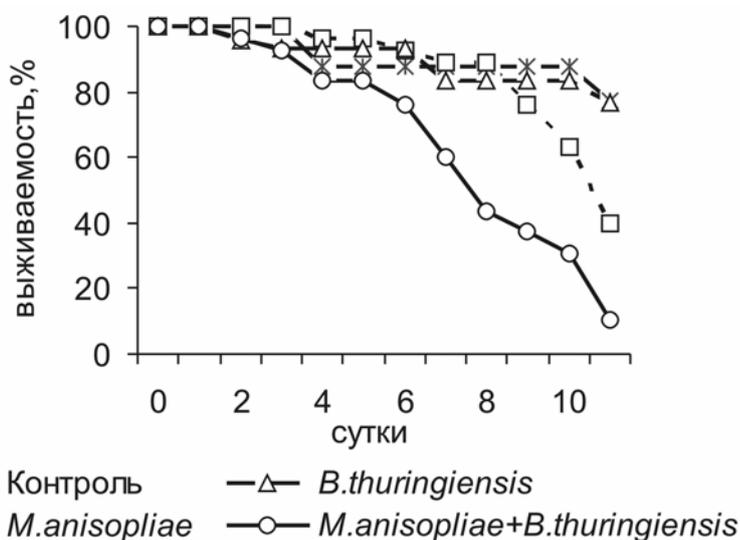


Рис. 1. Выживаемость личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* при инфицировании энтомопатогенными грибами *M. anisopliae* и бактериями *B. thuringiensis*.

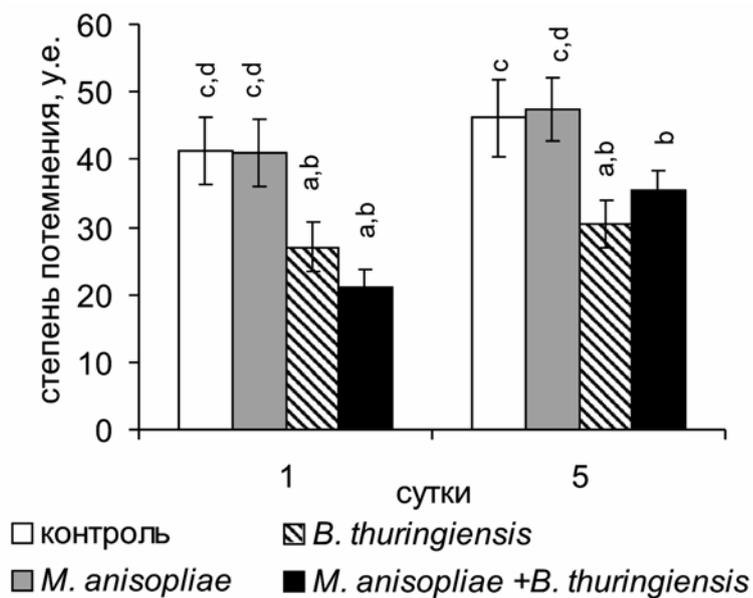


Рис. 2. Интенсивность инкапсуляции нейлонового имплантата у личинок колорадского жука при заражении грибами *M. anisopliae* и бактериями *B. thuringiensis*. ($a - p < 0.05$ по сравнению с контролем, b – по сравнению с *M. anisopliae*, c – по сравнению с *B. thuringiensis*, d – по сравнению со смешанным заражением (*M. anisopliae* + *B. thuringiensis*), $n = 30$).

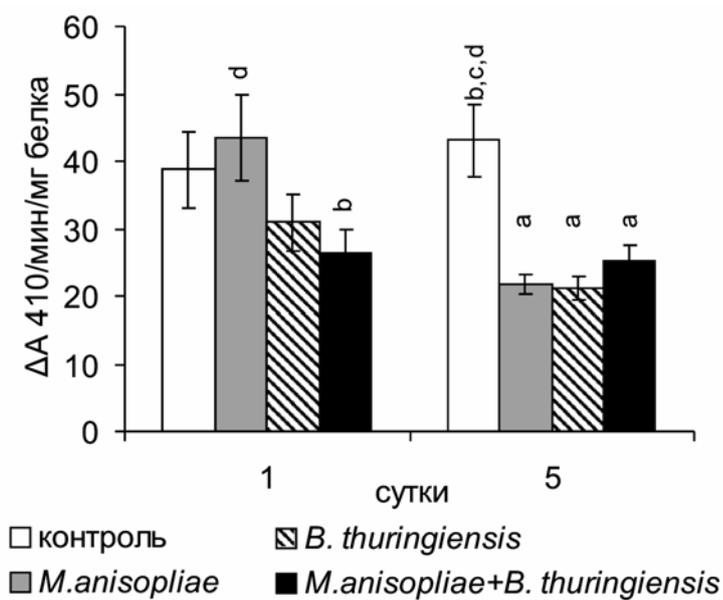


Рис. 3. Активность неспецифических эстераз в лимфе личинок колорадского жука при заражении грибами *M. anisopliae* и бактериями *B. thuringiensis*. ($a - p < 0.05$ по сравнению с контролем, b – по сравнению с *M. anisopliae*, c – по сравнению с *B. thuringiensis*, d – по сравнению со смешанным заражением (*M. anisopliae* + *B. thuringiensis*), $n = 10$).

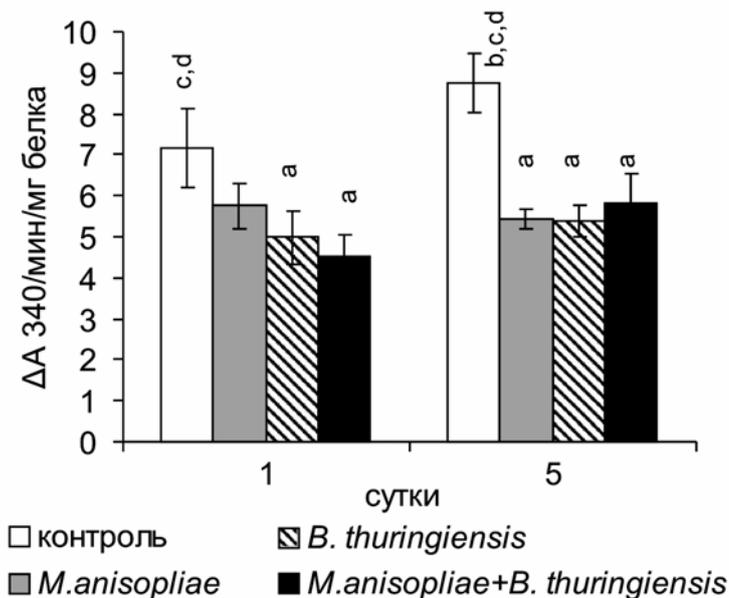


Рис. 4. Активность глутатион-S-трансфераз в лимфе личинок колорадского жука при заражении грибами *M. anisopliae* и бактериями *B. thuringiensis*. (*a* – $p < 0.05$ по сравнению с контролем, *b* – по сравнению с *M. anisopliae*, *c* – по сравнению с *B. thuringiensis*, *d* – по сравнению со смешанным заражением (*M. anisopliae* + *B. thuringiensis*), $n = 10$).

данных ферментов достоверно не отличалась от контроля. На 5-е сутки эксперимента зафиксировано снижение в 1.5–2 раза активности компонентов детоксицирующей системы во всех вариантах по сравнению с контролем (рис. 5 и 6).

Синергистический эффект при совместном действии гриба *M. anisopliae* и бактерии *B. thuringiensis* в смертности личинок колорадского жука может быть классифицирован как временной и усиливающий (Бенц, 1976). Полученные результаты согласуются с результатами лабораторных и полевых опытов, в которых осуществлялась одновременная обработка исследуемыми грибными и бактериальными энтомопатогенами, а также коммерческими биопестицидами на их основе (Wright, Ramos, 2005; Крюков и др., 2009). В этих работах авторы указывают, что вероятной причиной синергизма между грибными и бактериальными агентами является токсикоз, вызванный бактерией. При попадании бактерий в кишечник насекомого происходит общее ухудшение питания, вследствие чего происходит снижение веса, замедление роста и удлинение межличиночного периода. Все это может благоприятно действовать на проникновение гриба в гемоцель насекомого, однако в данных исследованиях изменения в организме насекомого на биохимическом уровне не рассматривались.

В большинстве исследований зафиксировано снижение показателей клеточного иммунитета при микозах. В частности, отмечено снижение интенсивности процесса инкапсуляции у личинок колорадского жука при развитии острого микоза, вызванного *M. anisopliae* (Dubovskiy et al., 2010). Ряд авторов приходит к выводу, что подавление процессов фагоцитоза и гранулообразования происходит за счет грибных метаболитов как при введении чистых грибных токсинов (Bandani, 2008), так и непосредственно при развитии грибной инфекции (Vilcinskas et al., 1997). В настоящей работе мы не зарегистрировали изменение интенсивности инкапсуляции под действием грибной инфекции. Вероятно, интенсивность этого процесса зависит от вида хозяина, общего физиологического состояния популяции, а также от количества инокулюма и вирулентных свойств самого патогена.

Представляет интерес обнаруженное нами снижение интенсивности инкапсуляции в вариантах с заражением насекомых бактериями (см. рис. 2). Проведенные на чешуекрылых исследова

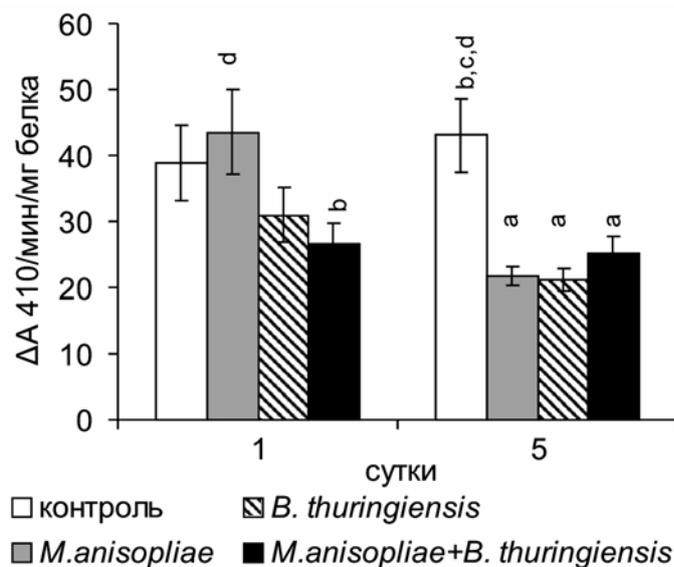


Рис. 5. Активность неспецифических эстераз в жировом теле личинок колорадского жука при заражении грибами *M. anisopliae* и бактериями *B. thuringiensis*. ($a - p < 0.05$ по сравнению с контролем, b – по сравнению с *M. anisopliae*, c – по сравнению с *B. thuringiensis*, d – по сравнению со смешанным заражением (*M. anisopliae* + *B. thuringiensis*), $n = 10$).

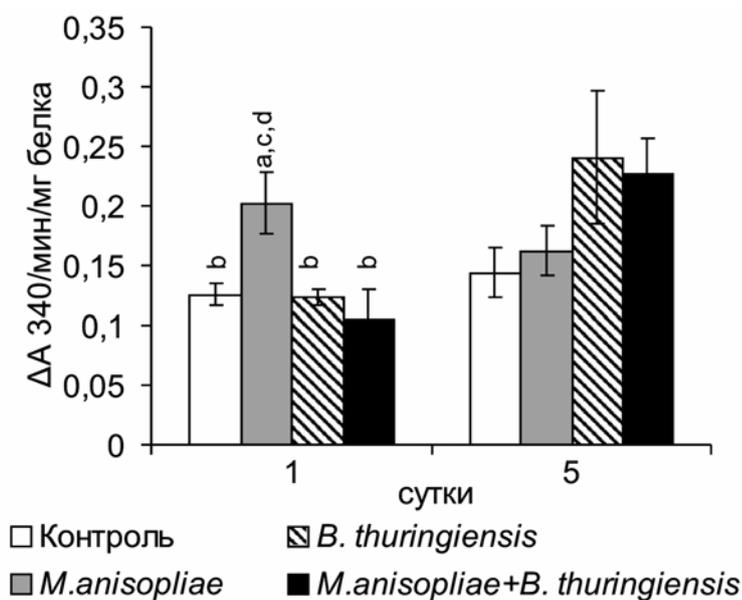


Рис. 6. Активность глутатион-S-трансфераз в жировом теле личинок колорадского жука при заражении грибами *M. anisopliae* и бактериями *B. thuringiensis*. ($a - p < 0.05$ по сравнению с контролем, b – по сравнению с *M. anisopliae*, c – по сравнению с *B. thuringiensis*, d – по сравнению со смешанным заражением (*M. anisopliae* + *B. thuringiensis*), $n = 10$).

ния свидетельствуют, что при заражении полулетальной концентрацией бактерий происходит достоверное ($p < 0.05$) 1.5-кратное снижение общего числа гемоцитов и интенсивности меланнизации нейлонового имплантата на 2-е и 3-и сутки инфекции (Дубовский и др., 2010). Полученные данные согласуются с работами других исследователей, в которых было показано, что в течение бактериальной инфекции *B. thuringiensis* у непарного шелкопряда *Limantria dispar* уменьшалось число гемоцитов (Broderick et al., 2010). Кроме того, подобные изменения числа гемоцитов наблюдались у резистентной к *B. thuringiensis* линии совки *Trichoplusia ni* (Ericsson et al., 2009).

Ранее мы показали, что под действием бактериальной кишечной инфекции происходит ухудшение питания и снижение веса личинок колорадского жука; при этом у насекомых, зараженных грибом, не происходило нарушения в интенсивности питания и изменении веса (Крюков и др., 2009). Вероятно, нарушение питания и снижение веса при бактериальной инфекции *B. thuringiensis* может приводить к снижению процесса инкапсуляции. Другими авторами показано, что вследствие нарушения питания у насекомых может снижаться уровень антибактериальной активности, интенсивность реакций клеточного иммунитета, активность фенолоксидазы (Lee et al., 2006).

Отмеченное увеличение активности неспецифических эстераз и ГСТ в гемолимфе личинок колорадского жука в начальный период грибной инфекции согласуется с полученными нами ранее результатами и данными других авторов (Серебров и др., 2006; Zibae et al., 2009; Dubovskiy et al., 2010). При развитии гриба внутри насекомого-хозяина патоген продуцирует большое количество ферментов и токсинов, необходимых для деградации тканей и их дальнейшей колонизации грибом (Charnley, 2003), однако в работе Зибая с соавторами (Zibae et al., 2009) на вредной черепашке *Eurygaster integriceps* (Puton) при обработке спорами и метаболитами *B. bassiana* увеличение активности эстераз и ГСТ происходило, начиная с 3–4-х суток. Стоит отметить, что изменение активности неспецифических эстераз и ГСТ в жировом теле насекомых при микозе не наблюдалось, что согласуется с работой Сереброва с соавторами (Серебров и др., 2006), в которой была показана активация ферментов при микозе лишь в плазме *G. mellonella*.

Нами было зафиксировано снижение активности детоксицирующих ферментов в жировом теле личинок колорадского жука при бактериозе. Изучение ферментов детоксицирующей системы при бактериозах, вызванных *B. thuringiensis*, практически не исследовано. Показана зависимость устойчивости комаров к *B. thuringiensis* и повышенной активности детоксицирующих ферментов (Boyer et al., 2007). В работе Гуннинга с соавторами (Gunning et al., 2005) на устойчивой линии хлопковой совки к *B. thuringiensis* была зафиксирована повышенная активность эстераз. Авторы предполагают, что повышенная устойчивость к *B. thuringiensis* может быть связана со способностью эстераз образовывать неактивные комплексы с протоксином и активированным токсином. Вероятно, снижение активности компонентов детоксицирующей системы при бактериозе может быть следствием кишечного токсикоза и угнетения активности детоксицирующей системы в гемоцели.

Важно отметить, что если при грибной инфекции наблюдалась экспрессия неспецифических эстераз и ГСТ в гемолимфе насекомых, то при смешанной инфекции данное увеличение активности ферментов не регистрировалось. Это, вероятно, говорит о том, что под действием бактерии происходит сдерживание активации ферментов, направленных на защиту от грибного патогенеза. Кроме того, снижение активности неспецифических эстераз и ГСТ в жировом теле личинок происходило под действием бактерий (как при моноинфекции, так и в смешанном заражении). Скорее всего, подавление активности ферментов детоксицирующей системы при бактериозе может увеличивать восприимчивость насекомых к грибам за счет снижения способности хозяина инактивировать метаболиты грибов. На 5-е сутки эксперимента мы зафиксировали общее снижение активности ГСТ и неспецифических эстераз в 1.5–2.0 раза под действием как моноинфекций, так и при смешанном заражении, что, возможно, связано с общим угнетением организма насекомого.

Таким образом, мы можем предположить, что снижение интенсивности процесса инкапсуляции и активности ферментов детоксицирующей системы под действием бактерий может вызывать снижение устойчивости насекомых к грибам, что, в свою очередь, приводит к ускоренной гибели хозяев и синергистическому эффекту в смертности насекомых.

Авторы признательны В.П. Ходыреву (ИСиЭЖ СО РАН) за помощь в проведении экспериментов. Работа поддержана грантами РФФИ, Президента РФ и Президиума СО РАН.

Литература

- Бенц Г. В. 1976. Синергизм микроорганизмов и химических инсектицидов // Микроорганизмы в борьбе с вредными насекомыми и клещами. М.: 105–123.
- Глулов В. В. 2001. Гуморальная система // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. М.: 523–561.
- Дубовский И. М., Гризанова Е. В., Черткова Е. А., Слепнева И. А., Комаров Д. А., Воронцова Я. Л., Глулов В. В. 2010. Генерация активированных кислородных метаболитов и активность антиоксидантов в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) при развитии процесса инкапсуляции // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 46(1): 35–43.
- Крюков В. Ю., Леднев Г. Р., Дубовский И. М., Серебров В. В., Левченко М. В., Ходырев В. П., Сагитов А. О., Глулов В. В. 2007. Перспективы применения энтомопатогенных гифомицетов (Deuteromycota, Nuyphomycetes) для регуляции численности насекомых // Евразийский энтомологический журнал. 6(2): 195–204.
- Крюков В. Ю., Ходырев В. П., Ярославцева О. Н., Каменова А. С., Дуйсембеков Б. А., Глулов В. В. 2009. Синергетическое действие энтомопатогенных гифомицетов и бактерий *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* при инфицировании личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* // Прикладная биохимия и микробиология. 45(5): 571–576.
- Леднев Г. Р., Крюков В. Ю., Ходырев В. П., Левченко М. В., Дуйсембеков Б. А., Сагитов О. А., Глулов В. В. 2007. Динамика гибели азиатской саранчи при синхронном заражении энтомопатогенными грибами (*Metarhizium anisopliae*, *Bauveria bassiana*) и бактерией *Pseudomonas* sp. // Сибирский экологический журнал. 4: 527–531
- Серебров В. В., Гербер О. Н., Мальярчук А. А., Мартемьянов В. В., Алексеев А. А., Глулов В. В. 2006. Влияние энтомопатогенных грибов на активность детоксицирующих ферментов гусениц пчелиной огневки *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) и роль детоксицирующих ферментов при формировании резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам // Известия РАН. Серия биологическая. 33(6): 712–718.
- Bajan C., Kmitova K. 1972. The effect of entomogenous fungi *Paecilomyces farinosus* (Dicks) Brown and Smith and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on the oviposition by *Leptinotarsa decemlineata* Say females and on the survival of larvae // *Ecologia Polska*. 20(32): 423–432.
- Bajan C. 1973. Changes in the pathogenicity of the entomopathogenic fungi under the influence of the method of culture and infection // *Ekologia Polska*. 46: 715–729.
- Bandani A. R. 2008. The effects of entomopathogenic fungus, *Tolypocladium cylindrosporum* on cellular defence system of *Galleria mellonella* // *Journal of Agricultural Science and Technology*. 10(2): 135–146.
- Boyer S., Tilquin M., Ravel P. 2007. Differential sensitivity to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and temephos in field mosquito populations of *Ochlerotatus cataphylla* (Diptera: Culicidae): toward resistance? // *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26(1): 157–162.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. 72(1–2): 248–254.
- Broderick N. A., Raffa K. F., Handelsman J. 2010. Chemical modulators of the innate immune response alter gypsy moth larval susceptibility to *Bacillus thuringiensis* // *BMC Microbiology*. 10: 129.
- Costa S. D., Barbercheck M. E., Kennedy G. G. 2001. Mortality of colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) after sublethal stress with the CryIIIa d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* and subsequent exposure to *Beauveria bassiana* // *Journal of Invertebrate Pathology*. 77(3): 173–179.
- Charnley A. K. 2003. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins // *Advances in Botanical Research*. 40: 241–321.
- Dubovskiy I. M., Krukova N. A., Glupov V. V. 2008a. Phagocytic activity and encapsulation rate of *Galleria mellonella* larval haemocytes during bacterial infection by *Bacillus thuringiensis* // *Journal of Invertebrate Pathology*. 98(3): 360–362.
- Dubovskiy I. M., Martemyanov V. V., Vorontsova Y. L., Rantala M. J., Gryzanova E. V., Glupov V. V. 2008b. Effect of the bacterial infection on the antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of larvae *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) // *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 148(1): 1–5.
- Dubovskiy I. M., Kryukov V. Yu., Benkovskaya G. V., Yaroslavtseva O. N., Surina E. V., Glupov V. V. 2010. Activity of the detoxificative enzyme system and encapsulation rate in the

- colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say) larvae under organophosphorus insecticide treatment and entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) infection // Евразийский энтомологический журнал. 9(4): 577–582.
- Ericsson J. D., Janmaat A. F., Lowenberger C., Myers J. H. 2009. Is decreased generalized immunity a cost of Bt resistance in cabbage loopers *Trichoplusia ni*? // Journal of Invertebrate Pathology. 100(2): 61–67.
- Griesch J., Vilcinskis A. 1998. Proteases released by entomopathogenic fungi impair phagocytic activity, attachment and spreading of plasmatocytes isolated from haemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella* // Biocontrol Science and Technology. 8(4): 517–531.
- Gillespie J. P., Bailey A. M., Cobb B., Vilcinskis A. 2000. Fungi as Elicitors of Insect Immune Responses // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 44(2): 49–68
- Gunning R. V., Dang H. T., Kemp F. C., Nicholson I. C., Graham D. M. 2005. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac10 toxin // Applied and Environmental Microbiology. 71(5): 2558–2563
- Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. 1974. Glutathione-S- transferases // Journal of Biological Chemistry. 249: 7130–7139.
- Lacey L. A., Kaya H. K. 2007. Introduction to microbial control // Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Dordrecht: 3–7.
- Lee K. P., Cory J. S., Wilson K., Raubenheimer D., Simpson S. J. 2006. Flexible diet choice offsets protein costs of pathogen resistance in a caterpillar // Proceedings of the Royal Society, B. 273: 823–829.
- Lewis L. C., Bing L. A. 1991. *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin for European corn borer control – program for immediate and season-long suppression // Canadian Entomologist. 123(2): 387–393.
- Martin P. A. W., Schroder R. F. W., Poprawski T. J., Lipa J. J., Hausvater E., Rasocha V. 2000. Temperature effects on the susceptibility of the colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin in Poland, the Czech Republic and the United States // Journal of Entomological Science. 35(3): 251–258.
- Mwambui L. A., Laing M. D., Miller R. 2009. Interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* var. israelensis for the control of house fly larvae and adults in poultry houses // Poultry Science. 88(11): 2307–2314.
- Prabhakaran S. K., Kamble S. T. 1995. Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of German cockroach, *Blattella germanica* (L.) // Insect Biochemistry and Molecular Biology. 25(4): 519–524.
- Rahman M. M., Roberts H. L. S., Sarjan M., Asgari S., Schmidt O. 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella* // Proceedings of the National Academy of Sciences. 101(9): 2696–2699.
- Serebrov V. V., Maljarchuk A. A., Shternshis M. V. 2007. Spontaneous variability of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. strains as an approach for enhancement of insecticidal activity // Plant Science (Sofia). 44(3): 236–239.
- Schwarzenbach G. A., Ward P. I. 2007. Phenoloxidase activity and pathogen resistance in yellow dung flies *Scathophaga stercoraria* // Journal of Evolutionary Biology. 20(6): 2192–2199.
- Vilcinskis A., Matha V., Gotz P. 1997. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. Journal of Insect Physiology. 43(5):475–483.
- Wraight S. P., Ramos M. E. 2002. Application parameters affecting field efficacy of *Beauveria bassiana* foliar treatments against colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* // Biological Control. 23(2): 164–178.
- Wraight S. P., Ramos M. E. 2005. Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* tenebrionis-based biopesticides applied against Weld populations of colorado potato beetle larvae // Journal of Invertebrate Pathology. 90(3): 139–150.
- Zibae A., Bandani A. R., Tork M. 2009. Effect of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, and its secondary metabolite on detoxifying enzyme activities and acetylcholinesterase (AChE) of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae) // Biocontrol Science and Technology. 19(5): 485–498.