

*На правах рукописи*

**Косман**

**Елена Сергеевна**

Экспрессия генов иммунного ответа вощинной огневки *Galleria mellonella* Linnaeus и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say при развитии грибных и сочетанных инфекций

1.5.14 – энтомология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2026



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Энтомопатогенные грибы являются естественными паразитами насекомых и перспективными агентами для экологически безопасного контроля численности вредителей (Weber et al., 2022). Грибы заражают своих хозяев, прикрепляясь конидиями к кутикуле, после чего проникают через покровы и колонизируют гемоцель. В кутикуле и гемоцеле запускаются каскады иммунных реакций, направленные на инактивацию профагул грибов, их ферментов и токсинов (Butt et al., 2016; Ma et al., 2024). Кроме того, поверхностные или внутренние бактериальные симбионты могут выступать в роли антагонистов грибов, подавлять их рост и развитие, тем самым препятствовать развитию микозов (Boucias et al., 2018; Hong et al., 2022; Zhao et al., 2024). Внутриклеточные бактериальные симбионты могут изменять физиологию насекомых, в том числе параметры, связанные с защитой от патогенных грибов (Engl et al., 2018). С другой стороны, грибные инфекции могут приводить к усиленной пролиферации симбиотических бактерий хозяина, миграциям бактерий между тканями, что может осложнять и ускорять развитие патогенезов (Wei et al., 2017; Bai et al., 2023). Взаимоотношения между грибами и бактериями в насекомых-хозяевах могут быть опосредованы факторами окружающей среды, такими как температура, ксенобиотики или паразитоиды, однако данные работы единичны.

Для насекомых характерен врожденный иммунный ответ, характеризующийся реакциями, основанными главным образом на процессах меланизации, инкапсуляции, фагоцитоза и выработки широкого спектра антимикробных факторов (Wojda, 2017). Важную роль в антибактериальных и антигрибных реакциях у насекомых играют различные антимикробные пептиды (АМП) (Buchon et al., 2014; Malassigné et al., 2021; Júnior et al., 2025), активированные кислородные метаболиты (АКМ) (Buchon et al., 2014), ингибиторы апоптоза (Zhang et al., 2020), связанные с иммуносигнальными путями Toll, IMD/MAPK, Jak/Stat и фенолоксидазным каскадом.

Несмотря на значительный прогресс в изучении иммунных реакций насекомых на различные патогены, многие ключевые

аспекты данной проблематики остаются нераскрытыми. В частности, недостаточно изучены механизмы, опосредующие влияние абиотических и биотических факторов среды на перестройку баланса в триаде «гриб–насекомое–бактериальные ассоцианты», что может определять переход симбиотических бактерий в разряд оппортунистических патогенов и приводить к альтернативным сценариям развития микозов. Детальное изучение этих взаимодействий будет способствовать разработке более эффективных стратегий биологического контроля численности насекомых-вредителей.

**Цель работы** – оценка изменений экспрессии генов иммунного ответа в организме насекомых при развитии микозов и сочетанных инфекций на фоне действия различных средовых факторов.

#### **Задачи:**

1. Установить влияние инфекционной нагрузки гриба *Beauveria bassiana* на развитие вторичных инфекций и экспрессию генов иммуносигнальных путей в разных тканях колорадского жука.

2. Оценить влияние яда паразитоида *Habrobracon hebetor* Say на развитие микозов и экспрессию генов иммунного ответа в тканях вощинной огневки.

3. Выявить действие микотоксина тенуазоновой кислоты на экспрессию генов иммунного ответа и развитие инфекций у вощинной огневки.

4. Проанализировать влияние разных температур на развитие микоза *Cordyceps militaris*, сопутствующих инфекций и экспрессию генов иммунного ответа в тканях вощинной огневки.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Вовлеченность симбиотических бактерий в процесс микоза зависит от остроты инфекционного процесса и средовых факторов: природных токсинов и температуры, которые обуславливают разный уровень экспрессии генов иммунного ответа.

2. Успешное развитие энтомопатогенных грибов в организме насекомого зависит от индукции антибактериального

ответа хозяина на определенных стадиях микозов и в конкретных тканях.

**Научная новизна.** Впервые установлены особенности модуляции иммунитета насекомых при грибных и сочетанных инфекциях под действием средовых факторов. Установлен дозозависимый исход грибной инфекции *B. bassiana* у личинок *Leptinotarsa decemlineata* Say. Показано, что умеренные дозы конидий вызывают активацию защиты со стороны сигнальных путей Toll, IMD и Jak/Stat, что позволяет грибу успешно завершить развитие. Высокие дозы вызывают более слабую индукцию антибактериальных систем (IMD, Jak/Stat), пролиферацию энтеробактерий в полости тела и гибель как хозяина, так и паразитического гриба.

Выявлен уникальный иммунный ответ на парализацию ядом паразитоида *H. hebetor* у личинок *Galleria mellonella* L. и инфекцию, вызванную *Metarhizium robertsii*: индукция генов антимикробных пептидов (АМП), АКМ-связанным *nox*, ингибитора апоптоза *iap* и белков теплового шока (*hsp*) в жировом теле и кутикуле, способствующая развитию паразитов.

Установлено влияние теназуоновой кислоты на иммунный ответ личинок *G. mellonella*, выражающееся в подавлении кишечного иммунитета через снижение экспрессии генов, связанных с продукцией АКМ (*nox*), АМП лизоцима, цекропина наряду с системной активацией генов антигрибных пептидов, что сопровождается усилением пролиферации симбиотических бактерий в кишечнике и усилением восприимчивости хозяина к *B. bassiana*.

Выявлена температурная модуляция иммунного баланса при инфекции, вызванной *C. militaris*, у личинок *G. mellonella*. При микозе низкая температура усиливает антибактериальный и снижает противогрибной иммунный ответ, что приводит к «классическому» микозу; высокая температура усиливает противогрибной и снижает антибактериальный иммунный ответ, что сопровождается бактериальным сепсисом.

**Теоретическая и практическая значимость.** Проведенное исследование взаимоотношений между насекомыми-хозяевами, энтомопатогенными грибами и симбиотическими

микроорганизмами выявляет новые стороны физиологических взаимодействий в системе патоген-хозяин, а также позволяет выяснить ряд адаптаций энтомопаразитических грибов к насекомым. Анализ влияния симбиотической микробиоты исследуемых насекомых на развитие патогенов открывает ряд 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 иммунитетом экономически значимых видов насекомых, что позволит ускорить развитие микозов и сочетанных инфекций.

**Степень достоверности результатов и апробации работы.** Достоверность полученных результатов обусловлена комплексным подходом к исследованию, использованием взаимодополняющих методов и соблюдением принципов надлежащей лабораторной практики. В работе применены стандартизированные протоколы, обеспечивающие воспроизводимость *in vitro* и *in vivo* экспериментов. Исследования проведены на репрезентативных выборках (не менее 30 особей в варианте). Все экспериментальные серии были воспроизведены в трех технических повторностях. Эксперименты проведены на лабораторных линиях насекомых с применением генотипированных грибных культур. Постоянный мониторинг патогенов в местах сбора колорадского жука позволил учесть природный фон. Использование сертифицированных приборов и реактивов обеспечило надёжность и воспроизводимость полученных данных. 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 трех всероссийских и международных конференциях: Всероссийская научная школа-конференция молодых ученых и студентов: «Генетические технологии в исследованиях природных соединений», (г. Владивосток, 2023 г.); I международная научно-практическая конференция: «Актуальные проблемы науки и

практики в исследованиях молодых ученых», (г. Новосибирск, 2024 г.); Международная молодежная конференция "Генетические и радиационные технологии в сельском хозяйстве», (г. Обнинск, 2024 г.).

**Публикации.** По материалам исследований опубликовано 7 работ, индексируемых в Web of Science и Scopus и входящих в перечень ВАК.

**Личный вклад соискателя.** Исследование патогенов насекомых, экспрессии генов иммунного ответа, обработка и анализ данных проведены непосредственно автором. Анализ численности бактерий в тканях колорадского жука и вошинной огневки проводился совместно с сотрудниками лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН. Метагеномный анализ сообществ бактерий вошинной огневки и колорадского жука проводился в ЦКП Геномика Института химической биологии и молекулярной медицины СО РАН.

**Структура и объем диссертации.** Рукопись состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Общий объем диссертации 136 страницы, включая 6 таблиц и 16 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 285 работ, в том числе 280 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, к.б.н. Ю.А. Носкову, к.б.н. М.В. Тюрину, к.с.-х.н. О.Г. Томиловой, У.Н. Рощкой за регулярные обсуждения результатов и помощь в экспериментальной работе. За предоставление метаболитов фитопатогенных грибов автор признательна к.б.н. А.О. Берестецкому (ВИЗР). За вклад в работу, связанный с молекулярным анализом бактериальных сообществ насекомых, к.б.н. М.Р. Кабилову и Т.Ю. Аликиной (ИХБФМ СО РАН). Автор выражает признательность зав. Карасукским научным стационаром ИСиЭЖ к.б.н. В.А. Шило за помощь в организации

полевых работ. Также я выражаю глубокую благодарность д.б.н. Е.А. Новикову и к.б.н. И. А. Белоусовой за полезные советы и замечания при подготовке рукописи. Особая признательность лаборанту исследователю Т.М. Марченко за помощь и поддержку. Исследования были проведены при финансовой поддержке грантов РФФИ № 19-14-00138, № 20-74-10043 и № 22-14-00309.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава «Литературный обзор», посвящена энтомопатогенным грибам, их взаимодействию с насекомыми-хозяевами и роли бактериальных ассоциантов в этом процессе. В ней описаны патологические процессы у насекомых, вызываемые грибами *M. robertsii*, *B. bassiana* и *C. militaris*. Представлен анализ по основным симбиотическим бактериям насекомых, которые могут выступать как антагонистами, так и синергистами энтомопатогенных грибов. Описаны механизмы иммунной защиты насекомых, которые включают внешние барьеры и внутренние механизмы. Рассмотрены основные сигнальные пути иммунитета насекомых Toll, Imd, JAK/STAT и приведено описание взаимодействия их компонентов. У модельных видов *G. mellonella* и *L. decemlineata* детально описаны иммунные реакции. Приведены имеющиеся данные по влиянию факторов среды на эффективность заражения насекомых энтомопатогенными грибами. Рассмотрены комплексные взаимодействия в системе "гриб–насекомое–бактерии", и выделены факторы, играющие ключевую роль в резистентности к энтомопатогенам.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы природные популяции колорадского жука (Новосибирская область), лабораторные популяции вошинной огневки *G. mellonella* и паразитоидов *H. hebetor*, культуры энтомопатогенных грибов *B. bassiana*, *M. robertsii*, *C. militaris* из коллекций ИСиЭЖ СО РАН.

*Дизайны экспериментов*

1. Для изучения, острого и пролонгированного микозов (*B. bassiana*) у личинок колорадского жука использованы концентрации конидий, приводящие к разным сценариям развития болезни: умеренная концентрация ( $10^6$  конидий/мл) – к развитию классического микоза с последующим спороношением на трупах; высокая концентрация ( $10^7$  конидий/мл) – к бактериальному разложению хозяина (Kryukov et al., 2025). Проведен общий анализ патогенезов, оценка КОЕ бактерий в тканях кутикулы, гемолимфы, кишечника и измерение уровня экспрессии генов факторов транскрипции иммуно-сигнальных путей Toll, Imd, JAK/STAT и ряда других генов в указанных тканях через 48 ч (контроль и оба типа микоза) и 96 ч (контроль и пролонгированный микоз).

2. Для оценки влияния яда *H. hebetor* на развитие микоза у вошинной огневки парализованные и не парализованные личинки были перкутанно заражены грибом *M. robertsii*, либо обработаны водным раствором Твина-20 (контроли). Через 48 ч проведен анализ экспрессии генов АМП, НАДФ-Н оксидазы, ингибитора апоптоза, ингибитора металлопротеиназ в кутикуле и жировом теле (Kosman et al., 2025).

3. Для исследования влияния теназуановой кислоты на экспрессию генов у вошинной огневки использовали скормливание кислоты в нулевой (контроль) и трех возрастающих концентрациях с последующей оценкой изменения массы личинок, КОЕ бактерий в среднем кишечнике (через 48 ч), экспрессии вышеуказанных генов в среднем кишечнике и жировом теле. Для анализа изменений восприимчивости к грибной инфекции использовали перкутанное инфицирование грибом *B. bassiana* (Kryukov et al., 2023).

4. Для исследования влияния температуры на развитие грибной и сочетанной инфекции и иммунный ответ у вошинной огневки личинок заражали инъекцией *C. militaris* и содержали при 15 °C и 25 °C (Kryukov et al., 2020). Контрольных личинок инъецировали физиологическим раствором. Через 96 ч оценивали КОЕ бактерий в гемолимфе и кишечнике, экспрессию генов АМП, НАДФ-Н оксидазы, ингибитора апоптоза, белков теплового шока в жировом теле и кишечнике.

В вышеуказанных схемах для анализа КОЕ бактерий использовали смыв с кутикулы либо гомогенизацию внутренних тканей с последующей серией разведения и посевом на эндоагар (для энтеробактерий) и желчно-эскулиновый агар (для бацилл) в 5-7 повторностях. Для определения структуры бактериальных сообществ проводили выделение ДНК из целого тела трупов с последующим метабаркодингом на платформе Miseq Illumina в ЦКП Геномика (Kryukov et al., 2020, 2025; Chertkova et al., 2023).

Для анализа экспрессии генов ткани насекомых выделяли в холодном фосфатном буфере и замораживали в жидком азоте. Затем ткани гомогенизировали в реагенте Лира и выделяли РНК в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию и чистоту РНК оценивали спектрофотометрически (NanoDrop, США). Общую РНК подвергали обратной транскрипции с использованием набора для синтеза кДНК RevertAid (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. qPCR проводили с использованием смеси HS-qPCR SYBR Blue (2×) на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Использовали 5-6 биологических повторностей для каждого варианта эксперимента. Экспрессию генов рассчитывали в соответствии с протоколом  $\Delta\Delta Cq$ , описанным в CFX Manager.

В качестве референсных генов колорадского жука использовались гены рибосомальных белков 4 и 18 (*rp4* и *rp18*) и факторы рибозилирования белков (*arf2* и *arf19*) (Rotskaya et al., 2021; Antonets et al., 2024). В качестве целевых изучена экспрессия генов *dorsal*, *nf-kb*, *stat*, *mesh*, *attacin* и *ricin-like  $\beta$ -lectin* (Rotskaya et al., 2021; Kryukov et al., 2025). В качестве референсных генов *G. mellonella* были использованы фактор элонгации 1-альфа 1 (*eEF1a*) и 11 субъединица ДНК-направленной РНК-полимеразы II. В качестве целевых изучена экспрессия генов антимикробных пептидов галлеримицина, галиомицина, Gloverина, цекропина, лизоцима, а также ингибитора металлопротеиназ (*impi*), ингибитора апоптоза (*iap*), гена содержащий домен NADF-H оксидазы (*nox*) и белков теплового шока (*hsp70* и *hsp90*) (Kryukov et al., 2020; Kosman et al., 2025).

Статистический анализ данных проведен в программах PAST 3.0, Statistica 8, Attestat, SigmaStat 3.1. Различия в динамике смертности анализировали с помощью логранк теста. Для оценки нормальности распределения данных иммунологических и физиологических параметров был применен W-тест Шапиро-Уилка. Нормально распределенные данные анализировались с помощью t-критерия Стьюдента (парные сравнения) или Тьюки-теста (множественные сравнения). Данные, имеющие ненормальное распределение были проанализированы с помощью критерия Манна-Уитни (парные сравнения) или Данна (множественные сравнения). Для двухфакторного анализа применялся непараметрический аналог Two-Way ANOVA – тест Шейфера-Рэя-Хэйра. Данные на графиках представлены в виде средних значений и стандартных ошибок (SE).

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1. Влияние грибной инфекционной нагрузки на развитие вторичных инфекций и иммунный ответ у колорадского жука

Установлено, что при развитии острой грибной инфекции *B. bassiana*, вызванной высокой дозой конидий, у личинок колорадского жука наблюдается резкий всплеск численности симбиотических бактерий, приводящий к септицемии, бактериальному распаду тканей и невозможности завершения жизненного цикла гриба (Рис. 1). В то же время при пролонгированном микозе (умеренная концентрация конидий) гриб успешно завершает жизненный цикл. При острой инфекции наблюдается подъем КОЕ энтеробактерий и бацилл на кутикуле в гемолимфе и в кишечнике, по сравнению с пролонгированным микозом (Рис. 1Б). В гомогенате личинок, погибших от острой инфекции, доминировали энтеробактерии *Citrobacter*.

Анализ экспрессии генов проведен через 48 ч для острой и пролонгированной инфекции, а через 96 ч только для пролонгированной инфекции, так как при острой инфекции насекомые к этому сроку погибали. В кутикуле транскрипционные факторы сигнальных путей Toll (*dorsal*) и IMD (*nf-kb*) существенно активировались через 48 часов после

заражения высокой концентрацией и через 96 часов после обработки низкой концентрацией. Важно, что наиболее сильное увеличение экспрессии *nf-kb* перед началом гибели было зарегистрировано именно при пролонгированной инфекции. Аналогичным образом, транскрипционный фактор пути Jak/Stat (*stat*) активировался только при пролонгированной инфекции. В жировом теле транскрипционные факторы путей Toll и IMD и Jak/Stat демонстрировали те же тенденции, что и в кутикуле, и наиболее сильная активация наблюдалась через 96 часов после обработки более низкой концентрацией гриба. Аналогичные паттерны экспрессии показали гены аттацина и рицинового- $\beta$ -лектина.

В среднем кишечнике изменения в уровне экспрессии *dorsal* и *nf-kb* были выражены значительно слабее (Рис. 2). Для генов *stat* и *mesh* регистрировалось либо отсутствие существенных различий, либо даунрегуляция, что свидетельствует об отсутствии патологических изменений в кишечнике.

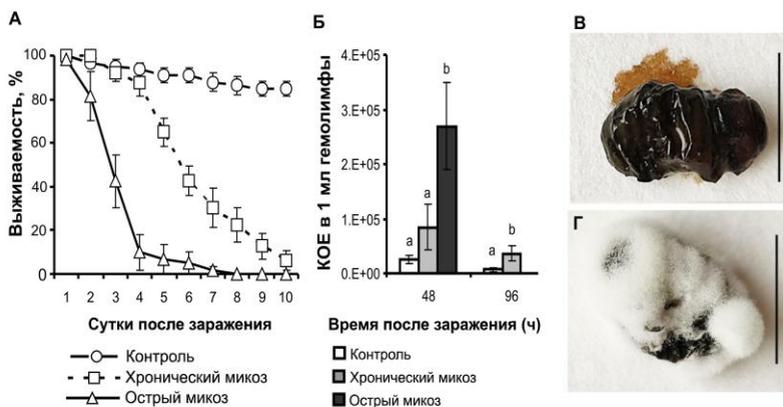


Рисунок 1. Выживаемость (А), КОЕ энтеробактерий в гемолимфе (Б), бактериальное разложение (В), грибное спороношение (Г) у личинок колорадского жука при развитии пролонгированной и острой инфекции *B. bassiana*. Разные буквы указывают на существенные различия между вариантами в каждой временной точке (тест Данна для 48 часов, тест Манна — Уитни для 96 часов,  $p < 0.05$ ).

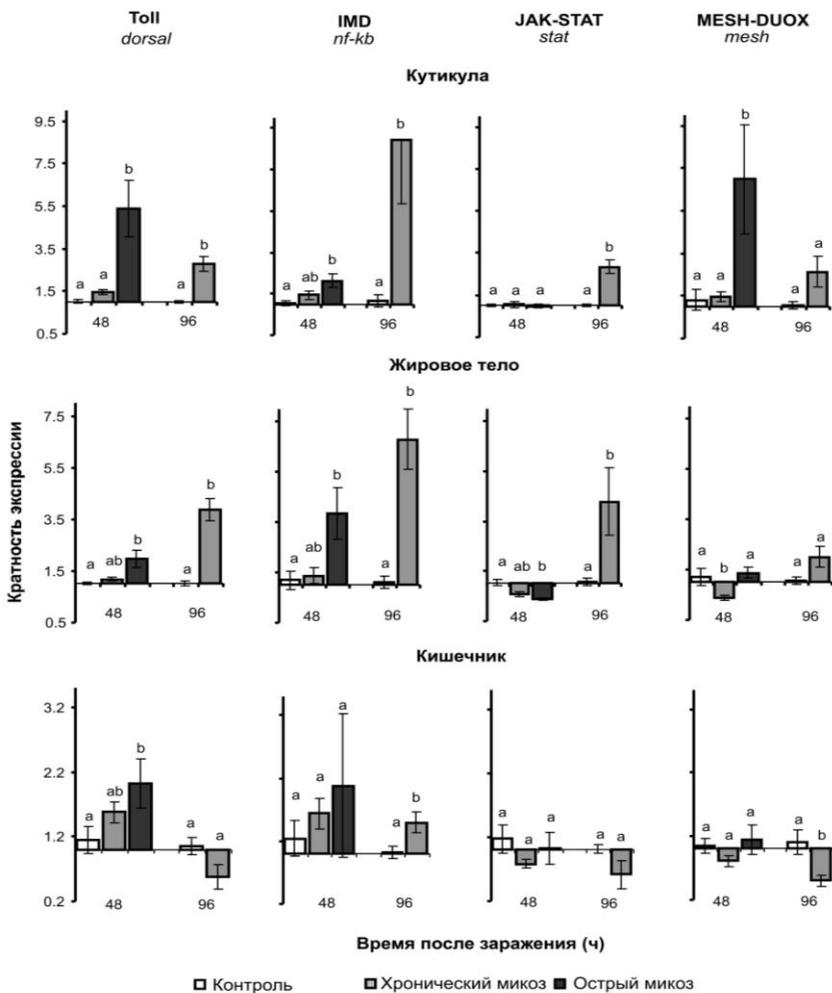


Рисунок 2. Изменения экспрессии транскрипционных факторов иммунно-сигнальных путей Toll, IMD и JAK-STAT, а также гена регулятора двойной оксидазы (*mesh*) в кутикуле, жировом теле и среднем кишечнике личинок колорадского жука при развитии пролонгированной и острой инфекции *B. bassiana*. Разные буквы указывают на существенные различия между вариантами в каждой временной точке (тест Данна для 48 ч и тест Манна-Уитни для 96 ч,  $p < 0.05$ ).

Таким образом, острая инфекция *B. bassiana* вызывает быстрое нарастание бактериальной нагрузки на кутикуле, в гемолимфе и кишечнике личинок колорадского жука. Ввиду стабильных условий в кишечнике мы полагаем, что проникновение бактерий в гемоцель происходит со стороны кутикулы из-за ее обширных повреждений. В отличие от пролонгированной инфекции, при остром течении перед гибелью слабее активируются антибактериальные защитные системы.

При острой грибной инфекции организм хозяина не успевает мобилизовать полноценную антибактериальную защиту, что приводит к быстрому размножению бактерий и невозможности развития гриба. Напротив, при медленном патогенезе умеренный рост бактериальной нагрузки сопровождается своевременной активацией иммунитета в кутикуле и жировом теле, обеспечивая классическое завершение цикла гриба. То есть в данном случае защитные системы хозяина благоприятствуют развитию паразитического гриба, что также согласуется с недавними работами, проведенными на чешуекрылых (Wang et al., 2023). Работа открывает перспективы управления развитием инфекции через модуляцию сигнальных путей колорадского жука.

### **3.2. Влияние яда паразитоида *Habrobracon hebetor* на развитие микоза и экспрессию генов у вошинной огневки**

На данной модели нами показано, что личинки вошинной огневки, парализованные ядом *H. hebetor* демонстрируют высокий уровень экспрессии генов иммунитета, связанных как антибактериальной, так и с антигрибной защитой (Kosman et al., 2025). В частности, парализация ядом *H. hebetor* и последующая инфекция *M. robertsii* индуцировали экспрессию генов АМП в жировом теле и кутикуле огневки (Рис. 3). Наиболее сильный подъем экспрессии наблюдался при совместном действии обоих факторов. В жировом теле основной вклад вносила парализация (двухфакторный анализ:  $H > 6.8$ ,  $p < 0.01$ ), в то время как влияние инфекции было выражено слабее ( $H > 2.8$ ,  $p = 0.7-0.9$ ), за исключением гена галлеримицина ( $H = 9.7$ ,  $p = 0.002$ ). В кутикуле оба фактора — как парализация ( $H > 5.1$ ,  $p < 0.02$ ), так и грибная

инфекция ( $H > 3.9$ ,  $p < 0.05$ ) — вызывали усиление экспрессии всех изученных генов АМП. Таким образом, парализованные личинки не только демонстрируют повышенный базовый уровень экспрессии генов АМП, но и способны усиливать эту реакцию в ответ на микоз.

Похожие паттерны экспрессии зарегистрированы для генов, регулирующих продукцию АКМ (*nox*) и ингибитора апоптоза (*iap*). Эффект парализации на усиление экспрессии *nox* и *iap* был существенным в кутикуле ( $H > 5.9$ ,  $p < 0.02$ ). Комбинированное действие инфекции и яда вызывало более сильный подъем экспрессии *nox* и *iap* по сравнению с их отдельным действием. Гены ингибитора металлопротеиназ (*impi*) и теплового шока (*hsp70*) существенно повышали экспрессию в обеих тканях только в ответ на действие яда ( $H > 12.0$ ,  $p < 0.001$ ).

Несмотря на индукцию экспрессии генов антигрибных пептидов, парализация резко повышала восприимчивость личинок к грибу *M. robertsii*. Смертность парализованных и зараженных грибом особей составляла 100%, тогда как у не парализованных заражённых личинок — лишь 10% ( $p < 0.001$ ).

Важно отметить, что у парализованных личинок резко повышался уровень пролиферации энтерококков и энтеробактерий на кутикуле и в кишечнике (Kryukov et al., 2022). Несмотря на подъем численности бактерий у парализованных личинок случаи септицемии были достаточно редки (Polenogova et al., 2019). Кроме того, данные личинки были устойчивы к условно-патогенным грибам *Fusarium*, *Aspergillus* и др. (Kryukov et al., 2017). Подъем экспрессии генов АМП ранее наблюдался и в других системах хозяин-паразит (Martinson et al., 2014). Мы полагаем, что изменения в экспрессии генов иммунного ответа хозяина в исследуемой системе могут работать в пользу паразитов: сдерживать развитие условных патогенов и способствовать успешному развитию личинок *H. hebetor* и/или грибов *Metarhizium* на парализованном хозяине.

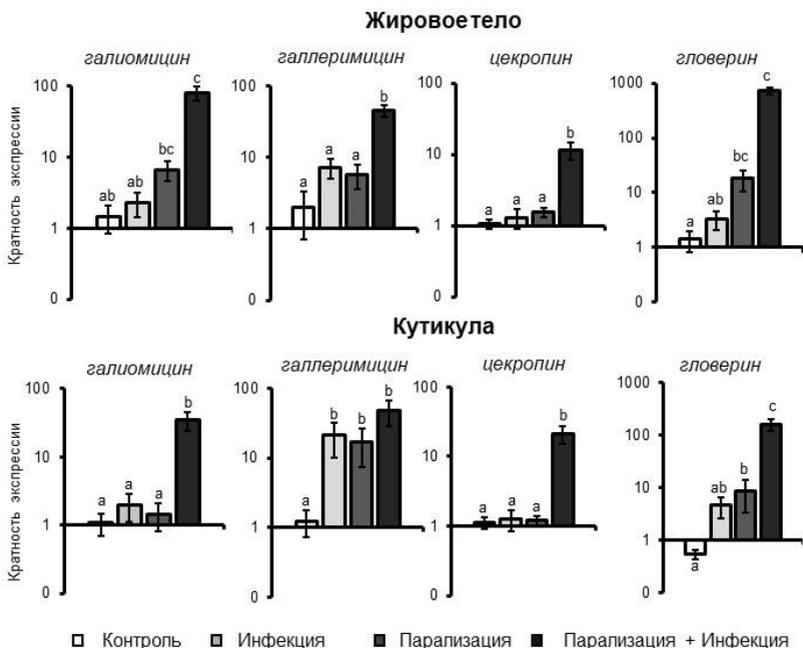


Рисунок 3. Экспрессия генов антимикробных пептидов в тканях жирового тела и кутикулы личинок вошинной огневки под влиянием парализации ядом *H. hebetor* и заражения *M. robertsii* относительно контроля. Разные буквы указывают на существенные различия между вариантами (тест Данна,  $p < 0.05$ ).

### 3.3. Влияние теназуоновой кислоты на экспрессию генов иммунитета вошинной огневки и развитие микоза

Установлено, что скармливание теназуоновой кислоты (ТК) приводит к снижению экспрессии гена НАДФН-оксидазы-4 (*nox*) и ряда генов АМП в кишечнике огневки, что сопровождается подъемом численности энтерококков в кишечнике и повышением восприимчивости к грибу *B. bassiana* (Рис. 4А,Б). ТК не приводила к изменениям в выживаемости огневки, но вызывала существенную задержку роста личинок (Kryukov et al., 2023).

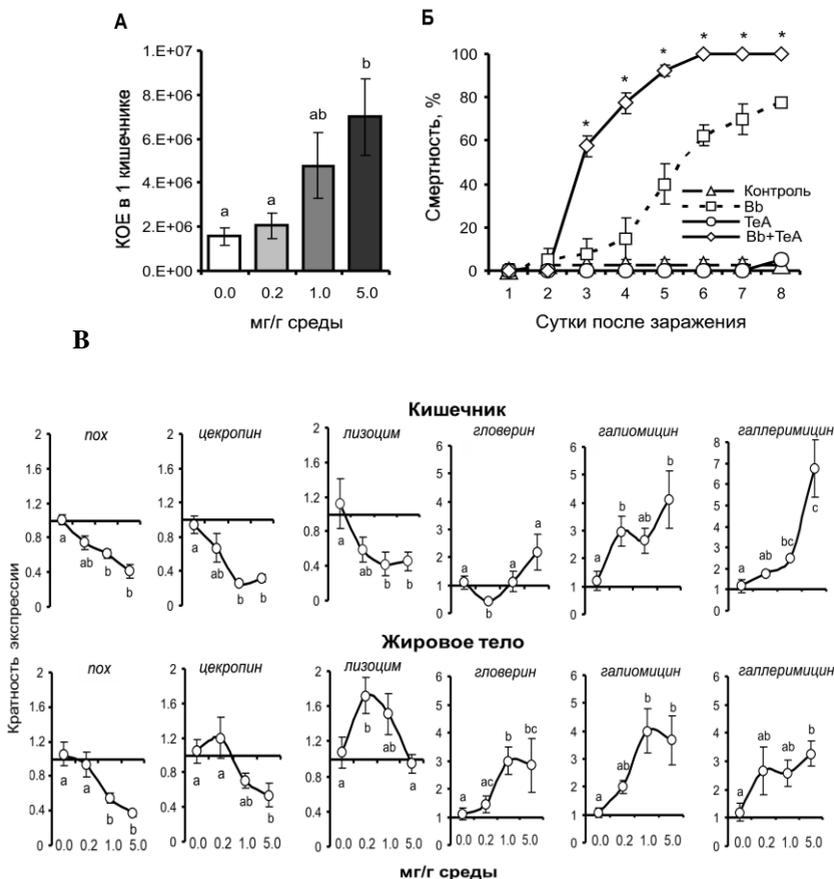


Рисунок 4. (А) – изменения численности энтерококков в среднем кишечнике личинок через 48 часов после скормливания ТК в концентрации 0.0 (контроль), 0.2, 1.0 или 5.0 мг/г среды. (Б) – влияние скормливания ТК и топиальной инфекции *B. bassiana* (Bb) на смертность личинок воштинной огневки. \*Синергетический эффект ( $p < 0.05$ ), рассчитанный посуточно. (В) – экспрессия генов, связанных с продукцией АМП и АКМ в среднем кишечнике и жировом теле воштинной огневки через 48 часов после начала питания ТК. Разные буквы указывают на значимые различия между вариантами (тест Данна,  $p < 0.05$ ).

Показано, что ТК вызывает зависимое от концентрации снижение экспрессии генов *lox*, цекропина и лизоцима в тканях среднего кишечника (Рис. 4В). Сходные паттерны изменения экспрессии регистрировались для этих генов и в жировом теле. С другой стороны, гены, кодирующие противогрибные пептиды (галиомицин и галлеримицин) показали дозозависимое усиление экспрессии в обеих тканях.

Таким образом, пероральное действие ТК вызывает у огневки подавление иммунных реакций в среднем кишечнике, что может быть причиной пролиферации энтерококков. В свою очередь повышение численности энтерококков в кишечнике (наряду с общей задержкой развития) может приводить к повышению восприимчивости личинок к *B. bassiana* (Polenogova et al., 2019). Повышение уровня экспрессии генов антигрибных пептидов не дает решающего противодействия развитию *B. bassiana*.

#### **3.4. Влияние температуры на развитие грибных и сочетанных инфекций и иммунный ответ у *Galleria mellonella***

Установлено, что при заражении вошинной огневки грибом *S. militaris*, в условиях 15°C (диапауза) и 25°C (активное состояние) наблюдалась 80–100% гибель (Рис. 5А). Однако в структуре смертности при 15°C преобладал микоз, а при 25°C – бактериозы (Рис. 5Б, Г, Д). Количество КОЕ энтерококков и энтеробактерий в гемолимфе и кишечнике было выше при 25°C по сравнению с 15°C (Рис. 5В).

Под влиянием грибной инфекции происходило значительное усиление экспрессии генов АМП как в жировом теле, так и в среднем кишечнике (Рис. 6). При этом, мы наблюдали более сильную экспрессию генов антигрибных пептидов (галлеримицина и галиомицина) при 25°C, а антибактериальных пептидов – при 15 °С. В частности, экспрессия гена галлеримицина в жировом теле усиливалась в 77 раз при 25 °С, но только в 12 раз при 15 °С по сравнению с контролем. Регуляция гена галиомицина в жировом теле увеличилась в 18 раз при 25 °С, но только в 8 раз при 15°C. Сходные паттерны отмечались для экспрессии этих генов в

кишечнике. Напротив, экспрессия гена антибактериального пептида гловерина в жировом теле в ответ на грибную инфекцию увеличивалась в 55 раз при 15 °С и только в 17 раз при 25 °С по сравнению с контролем. Для генов цекропина и лизоцима мы также наблюдали повышенную экспрессию в жировом теле при 15 °С по сравнению с 25 °С.

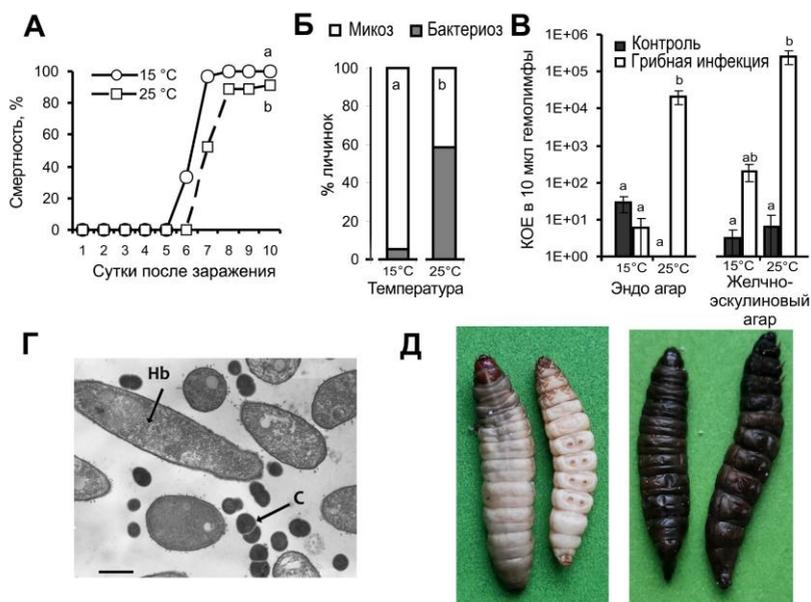


Рисунок 5. (А) – динамика смертности воцинной огневки после инъекций *C. militarum* (2500 конидий на личинку) и последующей инкубации при температуре 15 и 25 °С (разные буквы – логранк тест:  $p < 0.002$ ); (Б) — процент мумифицированных и разложившихся личинок в процессе развития микоза при разных температурах (разные буквы –  $\chi^2$ :  $p < 0.003$ ); (В) – КОЕ в гемолимфе личинок воцинной огневки через 96 часов после инъекций грибом и инкубацией при 15 и 25 °С (разные буквы – тест Данна:  $p < 0.05$ ); (Г) — гифальные тела *C. militarum* (Hb) и кокки (C) в гемолимфе огневки. Масштабная линейка — 1 мкм. (Д) – личинки, погибшие после заражения конидиями *C. militarum*: мумификация (слева) и бактериальное разложение (справа).

Изменения в экспрессии генов гловерина, цекропина и лизоцима в среднем кишечнике были менее выражены, чем в

жировом теле. Из других генов иммунного ответа, ингибитор апоптоза *iap* повышал экспрессию в жировом теле в ответ на грибную инфекцию только при низкой температуре. Экспрессия *pox* незначительно повышалась в жировой ткани в ответ на грибную инфекцию при обеих температурах ( $H = 4.2$ ,  $p = 0.04$ ), но влияние температуры было не существенным. Экспрессия генов теплового шока *hsp 70* и *hsp 90* была повышенной при низкой температуре.

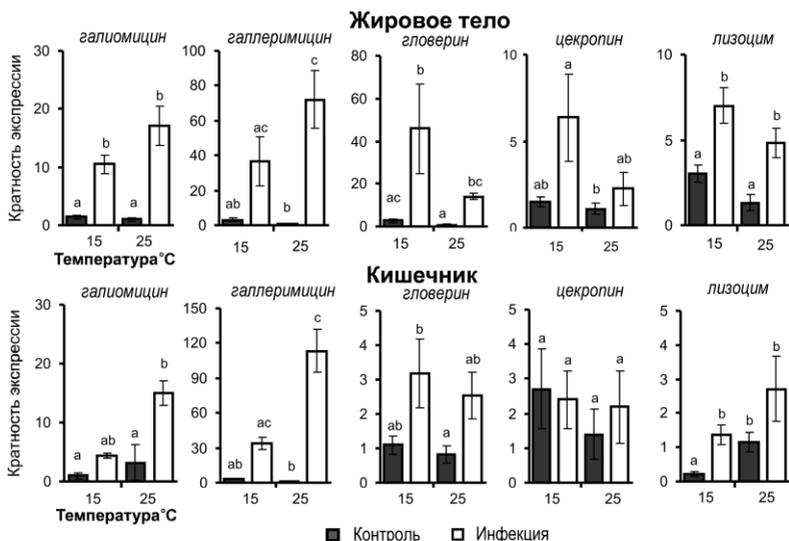


Рисунок 6. Экспрессия генов антимикробных пептидов в жировом теле и среднем кишечнике личинок воцинной огневки через 96 ч после инъекции *S. militar* и последующей инкубации при 15 °C и 25 °C. Представлены изменения относительно контроля при 25 °C. Разные буквы указывают на существенные различия между вариантами (тест Данна,  $p < 0.05$ ).

Влияние грибной инфекции отмечено только для *hsp 70* в жировом теле и было направлено на снижение экспрессии.

Таким образом, на системе *S. militar* – *G. mellonella* в условиях разных температур продемонстрированы взаимодействия между грибом и бактериальными ассоциантами

хозяина. При высоких температурах сочетанный патогенез развивается в сторону спонтанных бактериозов, в то время как при низких – в пользу микозов. При низкой температуре происходила относительно слабая активация экспрессии генов противогрибных пептидов наряду с усилением экспрессии антибактериальных пептидов, что может обеспечить стабильное развитие гриба. Кроме того, при низкой температуре нами зарегистрировано базовое или индуцированное грибной инфекцией повышение экспрессии генов ингибитора апоптоза и белков теплового шока, что может предотвращать разрушение тканей и способствовать стабильному развитию грибной инфекции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В недавних исследованиях было показано, что грибные инфекции могут приводить к пролиферации симбиотических бактерий хозяина, миграциям бактерий между тканями, что ускоряет течение микозов (Wei et al., 2017; Bai et al., 2023). Кроме того, микозы вызывают перестройку кишечного микробиома и перемещение бактерий из кишечника в гемоцель, существенно модулируя иммунный ответ. Грибы могут подавлять симбионтов хозяев с помощью токсинов (Fan et al., 2017; Sun et al., 2022) или путём индукции АМР в тканях хозяина (Wang et al., 2023), чтобы избежать конкуренции с бактериями и успешно завершить свой жизненный цикл. При этом влияние средовых факторов на взаимодействие в системе гриб-хозяин-бактериальные ассоцианты хозяина остается практически не изученным.

Нами выяснен ряд механизмов взаимодействий между энтомопатогенными грибами, симбиотическими бактериями и иммунитетом насекомого-хозяина. В целом при микозах наблюдается подъем численности симбиотических бактерий и иммунных реакций, направленных на сдерживание их пролиферации. В этом случае иммунитет хозяина, несомненно, работает в пользу грибного паразита, позволяя ему успешно воспроизвести следующую генерацию спор. При этом мы установили, что уровень пролиферации бактерий, реакции

иммунитета и исход развития болезни зависит от ряда факторов таких как концентрация спор грибов, температура, при которой протекает грибная инфекция, и воздействие разных токсинов. Для успешного развития гриба в хозяине дозы заражения должны быть умеренными, а развитие микоза – длительным, что позволяет вовремя активировать антибактериальные системы защиты. Пониженные температуры способствуют более высокой активации антибактериальных систем, что дает преимущество грибу. Природные токсические соединения могут способствовать развитию микозов, несмотря на активацию антигрибных систем у хозяина. Подходы к манипуляции иммунитетом насекомых – в сторону развития грибного паразита либо условных патогенов – могут найти применение в биологическом контроле экономически значимых видов.

## ВЫВОДЫ

1. Заражение личинок колорадского жука высокими концентрациями конидий гриба *Beauveria bassiana* ведет к всплеску численности симбиотических бактерий в тканях насекомого и слабой экспрессии генов, связанных с антибактериальной защитой (*nf-kb*, *stat*), что сопровождается генерализованным бактериозом и невозможностью развития микопатогена. Умеренные дозы конидий гриба приводят к более сильной активации антибактериальных систем хозяина, что обеспечивает успешное завершение жизненного цикла гриба.

2. Личинки вошинной огневки, парализованные ядом *Habrobracon hebetor*, активно реагируют на грибные инфекции усилением экспрессии генов антимикробных пептидов, ингибиторов апоптоза и НАДФН-оксидаз в кутикуле и/или жировом теле, что способствует блокированию вторичных инфекций и позволяет успешно закончить жизненный цикл паразитоидам или энтомопаразитическим грибам.

3. Скармливание тенуазоновой кислоты личинкам вошинной огневки вызывает подавление экспрессии генов НАДФН-оксидаз, цекропина и лизоцима в среднем кишечнике и жировом теле, что сопровождается пролиферацией бактерий

*Enterococcus* в кишечнике, общей задержкой развития хозяина и усилением восприимчивости к *Beauveria bassiana*.

4. У личинок вошинной огневки при развитии микоза *Cordyceps militaris* в условиях пониженных температур (15 °С) наблюдается более активная экспрессия генов антибактериальных пептидов, ингибитора апоптоза и белков теплового шока. Напротив, при 25 °С сильнее индуцируются гены антигрибных, но не антибактериальных пептидов. Эффекты соотносятся с разными сценариями гибели личинок: успешным завершением цикла гриба при 15 °С и преобладанием бактериозов при 25 °С.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК:

Kryukov, V. Y. Involvement of bacteria in the development of fungal infections in the Colorado potato beetle / V.Y. Kryukov, **E. Kosman**, I. Slepneva, Y.L. Vorontsova, O. Polenogova, G. Kazymov, T. Alikina, Y. Akhanaev, D. Sidorenko, Y.A. Noskov, A. Krivopalov, M.R. Kabilov, O. Yaroslavtseva //Insect Science. – 2025. – V. 32. – №. 2. – P. 600-620.

**Kosman, E. S.** Wax moth larvae demonstrate a high level of humoral immunity after envenomation by parasitoid *Habrobracon hebetor* / E.S. Kosman, O.N. Yaroslavtseva, N.A. Kryukova, U.N. Rotskaya, V.V. Glupov, V.Y. Kryukov //Entomologia Experimentalis et Applicata. – 2025. – V. 173. – №. 5. – P. 351-360.

Kryukov, V.Y. Tenuazonic acid alters immune and physiological reactions and susceptibility to pathogens in *Galleria mellonella* larvae / V.Y. Kryukov, **E.S. Kosman**, O.G. Tomilova, O.G. Polenogova, U.N. Rotskaya, O.N. Yaroslavtseva, D. Salimova, N.A. Kryukova, A.O. Berestetskiy //Mycotoxin Research. – 2023. – V. 39. – №. 2. – P. 135-149.

Antonets, M. Nearly complete genome sequences of the first two identified Colorado potato beetle viruses / M. Antonets, S. Bodnev, U. Rotskaya, **E. Kosman**, T. Tregubchak, T. Bauer, M. Azaev, V. Kryukov, D. Antonets //Scientific Reports. – 2024. – V. 14. – №. 1. – P. 352.

Chertkova, E. Links between soil microbiomes and fungistasis toward fungi infecting the Colorado potato beetle / E.

Chertkova, M. R. Kabilov, O. Yaroslavtseva, O. Polenogova, **E. Kosman**, D. Sidorenko, V. Y. Kryukov //Microorganisms. – 2023. – V. 11. – №. 4. – P. 943.

Rotskaya, U. N. Identification of the Ricin-B-Lectin LdRBLk in the Colorado potato beetle and an analysis of its expression in response to fungal infections / U.N. Rotskaya, V.Y. Kryukov, **E. Kosman**, M. Tyurin, V. V. Glupov //Journal of Fungi. – 2021. – V. 7. – №. 5. – P. 364.

Kryukov, V. Y. Interplay between fungal infection and bacterial associates in the wax moth *Galleria mellonella* under different temperature conditions / V.Y. Kryukov, **E. Kosman**, O. Tomilova, O. Polenogova, U. Rotskaya, M. Tyurin, T. Alikina, O. Yaroslavtseva, M. Kabilov, V. Glupov //Journal of Fungi. – 2020. – V. 6. – №. 3. – P. 170.

### **Материалы и тезисы конференций:**

**Косман, Е.С.** Микробные ассоцианты колорадского жука в период гибернации, роль динамики параметров иммунитета в развитии инфекции / **Е.С. Косман**, У.Н. Роцкая, В.Ю. Крюков, О.В. Поленогова, Я.Ю. Чумакова, В.В. Морозова, О.Н. Ярославцева, Ю.А. Носков // Генетические технологии в исследованиях природных соединений. Всероссийская научная школа-конференция молодых ученых и студентов. Владивосток, 3–7 октября – 2023. – С.42.

**Косман, Е.С.** Влияние яда паразитоида *Habrobracon hebetor* и энтомопатогенного гриба на иммунитет вошинной огневки / **Косман Е.С.**, О.Н. Ярославцева, Н.А. Крюкова, У.Н. Роцкая, В.В. Глупов, В.Ю. Крюков // Международный форум молодых ученых «Актуальные проблемы науки и практики в исследованиях молодых ученых». Новосибирск, 21-22 мая – 2024. – С. 129-133.

**Косман, Е.С.** Экспрессия генов иммунного ответа у колорадского жука при метаморфозе и в ответ на грибную инфекцию / **Е.С. Косман**, О.Н. Ярославцева, У.Н. Роцкая, Ю.Н. Носков, В.Ю. Крюков // Международная молодежная конференция «Генетические и радиационные технологии в сельском хозяйстве». Обнинск, 23-24 октября – 2024. – С. 46-49.