

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ СИСТЕМАТИКИ И ЭКОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

На правах рукописи

**УДК 592**

**Косман Елена Сергеевна**

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

**1.5.14 – энтомология**

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

**Научный руководитель –**

**доктор биологических наук**

**В. Ю. Крюков**

Новосибирск – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	11
1.1. Общая характеристика микозов насекомых.....	11
1.1.1. Общая характеристика грибов <i>Metarhizium robertsii</i> , <i>Beauveria bassiana</i> и <i>Cordyceps militaris</i> .....	11
1.1.2. Развитие грибных патогенов у насекомых .....	12
1.2. Бактериальные ассоцианты насекомых и их взаимодействия с грибными патогенами .....	16
1.2.1. Бактерии как часть антигрибных защитных систем .....	16
1.2.2. Бактерии, осложняющие и усиливающие развитие микозов .....	21
1.2.3. Вклад факторов среды в развитие грибных и сочетанных инфекций.....	23
1.3. Механизмы резистентности насекомых к бактериальным и грибным инфекциям.....	27
1.3.1. Кутикула и кишечник как основные барьеры для проникновения патогенов.....	27
1.3.2. Реакции иммунитета .....	29
1.3.3. Особенности функционирования иммуно-сигнальных путей у вошинной огневки .....	40
1.3.4. Иммуно-сигнальные пути колорадского жука .....	41
1.4. Заключение по литературному обзору .....	44
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	46
2.1. Насекомые и грибы.....	46
2.2. Дизайн экспериментов и процедуры биотестирования .....	47
2.2.1. Влияние концентрации конидий на развитие инфекций и экспрессию генов .....	47
2.2.2. Влияние яда <i>H. hebetor</i> на развитие инфекций и экспрессию генов .....	48
2.2.3. Влияние токсина фитопатогенных грибов – тенауазоновой кислоты на иммуно-физиологические параметры и развитие инфекций .....	48

2.2.4. Влияние температур на развитие инфекций и экспрессию генов иммунитета .....	49
2.3. Подсчёт колониеобразующих единиц бактерий и анализ бактериальных сообществ.....	50
2.4. Оценка накопления гифальных тел грибов в гемолимфе насекомых и продукции конидий на трупах .....	51
2.5. Оценка количества потребляемой пищи .....	52
2.6. Анализ экспрессии генов.....	52
2.7. Статистическая обработка данных.....	54
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	55
3.1. Влияние грибной инфекционной нагрузки на развитие вторичных инфекций и иммунный ответ у колорадского жука .....	55
3.1.1. Общая характеристика острого и пролонгированного микозов колорадского жука .....	55
3.1.2. Анализ изменения бактериальных сообществ в различных тканях у личинок колорадского жука при остром и пролонгированном микозе .....	56
3.1.3. Анализ экспрессии генов иммунного ответа в различных тканях личинок колорадского жука при остром и пролонгированном микозе.....	61
3.2. Влияние яда паразитоида <i>Habrobracon hebetor</i> на развитие микоза и экспрессию генов у вощинной огневки .....	66
3.2.1. Изменение восприимчивости личинок <i>Galleria mellonella</i> к грибу после парализации паразитоидом .....	67
3.2.2. Анализ экспрессии генов иммунного ответа у вощинной огневки при парализации и микозе .....	68
3.3. Влияние тенуазоновой кислоты на экспрессию генов иммунитета вощинной огневки и развитие микоза .....	76
3.3.1. Влияние тенуазоновой кислоты на общие физиологические показатели личинок <i>Galleria mellonella</i> и восприимчивость к <i>Beauveria bassiana</i> .....	76

3.3.2. Анализ экспрессии генов иммунного ответа у личинок <i>Galleria mellonella</i> при скармливании тетуазоновой кислоты .....	77
3.4. Влияние температуры на развитие грибных и сочетанных инфекций и иммунный ответ у <i>Galleria mellonella</i> .....	82
3.4.1. Развитие микоза <i>Cordyceps militaris</i> и сочетанной инфекции у вошинной огневки при различных температурах .....	82
3.4.2. Анализ изменения бактериальных сообществ в тканях личинок <i>Galleria mellonella</i> при различных температурах.....	84
3.4.3. Анализ экспрессии генов иммунного ответа в тканях личинок <i>Galleria mellonella</i> при различных температурах.....	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	92
ВЫВОДЫ.....	97
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	98
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	133

# ВВЕДЕНИЕ

## 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 пропагул 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 патогенозов (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, 2017b). 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 и задачи работы**

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 вошинной огневки.
3. Выявить действие микотоксина тенуазоновой кислоты на экспрессию генов иммунного ответа и развитие инфекций у вошинной огневки.
4. Проанализировать влияние разных температур на развитие микоза *Cordyceps militaris*, сопутствующих инфекций и экспрессию генов иммунного ответа в тканях вошинной 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 тенауазоновой 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 *S. 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 энтомопатогенных грибов к насекомым. Анализ влияния симбиотической микробиоты исследуемых насекомых на развитие патогенезов открывает ряд новых перспектив в области эко-иммунологии, направленных на понимание межвидовых взаимоотношений в многокомпонентных системах. Развитие данного подхода в будущем позволит решить ряд прикладных задач. В частности, это даст возможность создать новые подходы к управлению 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 патогенезов насекомых, экспрессии генов иммунного ответа, а также защитных систем насекомых, 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 тканей 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 страниц,

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. Роцкой 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 РФФ № 19-14-00138, № 20-74-10043, № 22-14-00309.

## Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Общая характеристика микозов насекомых

#### 1.1.1. Общая характеристика грибов *Metarhizium robertsii*, *Beauveria bassiana* и *Cordyceps militaris*

Энтомопатогенные грибы представлены более чем 1000 видами и встречаются в различных систематических группах (Araújo, Hughes, 2016). Наибольшее количество представителей энтомопатогенных грибов находится в отделе Ascomycota, порядке Нуроскреалес. Одни из наиболее распространенных видов, инфицирующих наземных членистоногих, – это аскомицеты *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., Rehner & Humber, относящийся к семейству Clavicipitaceae (Nishi, 2024), *Beauveria bassiana* (Balsamo-Criv.) Vuillemin и *Cordyceps militaris* (L.) Fr. относящиеся к семейству Cordycipitaceae (Kepler et al., 2017).

Энтомопатогенные грибы *M. robertsii*, *B. bassiana* и *C. militaris* обитатели почвы, лесной подстилки, а также внутренних тканей растений. Эти виды – космополиты, встречающиеся в экосистемах субарктического, умеренного, тропического и экваториального поясов (Vega et al., 2012). Данные виды вызывают регулярную естественную гибель насекомых на энзоотическом или эпизоотическом уровнях. *M. robertsii* и *B. bassiana* – виды генералисты, поражающие насекомых разных отрядов (Hemiptera, Orthoptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera и др.) (Vega et al., 2012; Araújo, Hughes, 2016). При этом указанные грибы способны поражать все стадии развития насекомых от яйца до имаго (Vega et al., 2012). В природе наиболее частыми хозяевами *C. militaris* являются личинки и куколки чешуекрылых; реже – жесткокрылые, перепончатокрылые и двукрылые насекомые (Shrestha et al., 2012). Оптимальные температуры развития *M. robertsii*, *B. bassiana* и *C. militaris* лежат в диапазоне 20–28 °C (Islam, et al., 2021; Tkaczuk, Majchrowska-Safaryan, 2023). При этом у *M. robertsii* оптимум сдвинут к более высоким температурам (30 °C), у *C. militaris*

к низким (20 °C), а *B. bassiana* имеет промежуточный оптимум (25 °C) (Kryukov et al., 2018a).

Жизненный цикл грибов *M. robertsii*, *C. militaris* и *B. bassiana* по Б. А. Борисову (2001), разделяют на 3 основные стадии:

1. Патогенная стадия, которая представляет собой адгезию конидий на кутикуле насекомого, затем их прорастание и проникновение через кутикулу и процесс развития гриба в теле насекомого, в течение которого происходит колонизация тканей и органов. В дальнейшем из сплетения гиф гриба формируется склероций.

2. Некротрофная стадия, во время которой происходит рост гиф гриба на поверхность через кутикулу хозяина и образование дочерних конидий на погибшем насекомом.

3. Заключительная стадия – стадия покоя. После попадания конидий во внешнюю среду, они могут сохраняться в опавших листьях, почве, на различных частях растений, где способны находиться длительное время.

Для энтомопатогенных аскомицетов характерно несколько типов спор. Инфекционные структуры – это конидии и аскоспоры. Конидии созревают на воздушном мицелии грибов после его прорастания на трупах насекомых либо на твердых питательных средах. Аскоспоры формируются в специализированных плодовых телах при формировании половой стадии и активно распространяются через «отстрел». Гифальные тела и бластоспоры формируются в жидких субстратах: гемолимфа насекомых или жидкие питательные среды.

### **1.1.2. Развитие грибных патогенов у насекомых**

Энтомопатогенные аскомицеты одни из немногих патогенов, способных инфицировать насекомых через экзоскелет, посредством адгезии к эпикутикуле и дальнейшего проникновения в гемоцель. Этот механизм считается основным способом инфицирования хозяев, однако описаны отдельные случаи, когда грибы могут проникать в гемоцель через кишечник (Constanza Mannino et al., 2019)

Адгезия конидий грибов *M. robertsii* и *B. bassiana* на поверхности покровов при заражении насекомых происходит за счет гидрофобных связей между белками клеточной стенки конидий и эпикутикулы насекомого (Butt et al., 2016). Эпикутикула обладает гидрофобностью, характеризуется ограниченным содержанием питательных веществ и воды и преобладанием в составе соединений углеводов (алканы и/или алкены) и жирных кислот (Pedrini et al., 2013; Pedrini, 2018).

При развитии на/в кутикуле происходит дифференциация инфекционных структур патогенов, в частности происходит прорастание спор, формирование ростовых трубок и аппрессориев (Ma et al., 2024; Hong et al., 2024). Жирные кислоты и углеводороды на поверхности кутикулы способны оказывать как стимулирующее действие, так и фунгистатический эффект, при этом регулируя продукцию гидролитических ферментов и ингибируя или стимулируя прорастание (Keyhani, 2018; Wrońska et al., 2018).

Энтомопатогенные грибы продуцируют ряд гидролитических ферментов для проникновения через кутикулу, таких как липазы, протеазы и хитиназы (Mukherjee, Vilcinskis, 2018; Wang et al. 2021). Особенно стоит выделить протеазы, эндохитиназы, а также комплекс цитохромов P450, которые метаболизируют углеводороды и жирные кислоты на поверхности насекомых (Zhang et al., 2025; Feyereisen, 2020). Эндохитиназы оказывают непосредственное действие на хитин, который является основным составляющим кутикулы, а протеазы приводят к деградации белков прокутикулы (Ortiz-Urquiza, Keyhani, 2013). Качественный состав ферментов у грибов, в том числе протеаз, липаз, монооксигеназ и других, зависит от спектра хозяев, на которых способен паразитировать грибок, т.е. грибы с широкой специализацией обладают более разнообразным ферментным составом, по сравнению с видами специалистами (Hu et al., 2014; Wang, Wang, 2017).

После проникновения через кутикулу грибы как правило инкапсулируются клетками хозяина, а в случае преодоления этого барьера они формируют гифальные

тела в гемоцеле и переходят к активному вегетативному росту. Они интенсивно наращивают биомассу, используя питательные ресурсы организма-хозяина (Wilberts et al., 2023). Вторичные метаболиты энтомопатогенных грибов играют важную роль в развитии инфекции, воздействуя на физиологические процессы организма-хозяина и подавляя активность конкурирующих микроорганизмов (Hong et al., 2024). Помимо этого, вторичные метаболиты энтомопатогенных грибов способны менять поведение насекомых, модулировать их иммунные реакции и другие физиологические процессы (Zhang et al., 2025). Наиболее хорошо изучены циклические пептидные токсины деструксины, продуцируемые грибами *Metarhizium* (Wang et al., 2012) и ооспореины продуцируемые *Baeuveria* (Wang et al., 2021). Деструксины являются гексадецепептидами, и способны нарушать функционирование кальциевых каналов, работу цитоскелета, а также вызывать супрессию фагоцитоза, инкапсуляции и меланизации (Lu, Leger, 2016; Nan et al., 2022). Помимо этого, в ряде работ рассмотрены такие свойства деструксинов как угнетение продукции антимикробных пептидов, изменение экспрессии генов ингибиторов сериновых протеиназ и генов, отвечающих за антиоксидантные ферменты хозяина (Hu et al., 2014; Lu, Leger, 2016). Известно, что *Beauveria* производит несколько метаболитов, включая бассианин, боверицин, бассианолид, бовериолид, бассиакридин, ооспореин и тенеллин (Wang et al., 2021). На финальных стадиях грибковой инфекции у вощинной огневки ооспореин *B. bassiana* выполняет антимикробную функцию, блокируя размножение симбиотических бактерий, что способствует эффективному поглощению грибом питательных веществ из тканей хозяина и последующей споруляции на покровах (Fan et al., 2017; Mc Namara et al., 2019). В процессе колонизации грибом хозяина поражаются практически все ткани насекомого и происходит его гибель. После того как гифы гриба полностью колонизировали тело хозяина, в гемоцеле формируется склероций — плотная мицелиальная структура, а затем происходит образование репродуктивных структур на покровах

насекомого – у родов *Metarhizium* и *Beauveria* конидиального спороношения, у *S. militaris*, конидиального спороношения, либо стром с перитециями.

Успешность инфицирования энтомопатогенными аскомицетами возрастает у насекомых, ослабленных неблагоприятными условиями, так как их патогенез критически зависит от функционального состояния организма-хозяина (Islam et al., 2021). Под воздействием неблагоприятных факторов, таких как субоптимальные для хозяев температуры, воздействие токсикантов различного генеза, наличие заболеваний бактериальной этиологии, происходит повышение восприимчивости к грибам (Kryukov et al., 2021a). Однако при этом может меняться сценарий патогенезов в сторону преобладания симптомов сочетанных инфекций или бактериозов.

Взаимодействие энтомопатогенных грибов и симбиотических бактерий в организме хозяина представляет собой сложную систему, где бактерии могут выступать как конкуренты или модуляторы патогенеза (Toledo et al., 2011; Wei et al., 2017; Miller et al., 2021). В ряде случаев микозы представляют собой не просто грибную моноинфекцию, симбионтные бактерии могут вовлекаться в процесс патогенеза и усиливать или подавлять восприимчивость хозяина к микозу (Boucias et al., 2018).

На течение микозов и сочетанных инфекций оказывают влияние абиотические и биотические стрессоры, такие как температура, УФ, различные токсические соединения (растительные и микробные метаболиты, инсектициды), а также паразитоиды (Ortiz-Urquiza, Keyhani, 2013; Butt et al. 2016). Однако влияние абиотических и биотических стрессоров на физиологические взаимодействия в системе гриб-хозяин-микробиота изучено весьма слабо (подробнее см. раздел 1.2.3. Вклад факторов среды в развитие грибных и сочетанных инфекций).

## **1.2. Бактериальные ассоцианты насекомых и их взаимодействия с грибными патогенами**

При возникновении микозов энтомопатогены вступают во взаимодействие с симбиотическими микроорганизмами, обитающими на поверхности тела, в полости тела и кишечнике насекомого (Boucias et al., 2018). Данные взаимоотношения могут проявляться в двух формах:

Прямое воздействие — через конкуренцию между микроорганизмами (антагонизм) (Van Moll et al., 2021);

Опосредованное влияние — через активацию или супрессию иммунных механизмов хозяина, включая гуморальные и клеточные реакции (Horak et al., 2020).

В первом случае симбиотические бактерии обычно усиливают защитные функции насекомого (Van Moll et al., 2021), тогда как во втором случае они могут как подавлять активность гриба, так и усиливать его патогенное действие (Stevens et al., 2021).

### **1.2.1. Бактерии как часть антигрибных защитных систем**

Симбиотические бактерии насекомых играют множество физиологических ролей в метаболизме хозяина, включая переваривание пищи, обеспечение необходимыми питательными веществами, синтез витаминов, предотвращение размножения патогенов путём выработки антибиотиков или стимуляции иммунной системы хозяина, расщепление фитотоксинов и пестицидов (Mondal et al., 2023; Shamjana et al., 2024). На сегодняшний день у большинства отрядов насекомых выявлены микробные симбионты, которые потенциально могут способствовать защите от патогенов (Van Moll et al., 2021; Kaltenpoth et al., 2025).

Большинство бактериальных симбионтов насекомых относится к *Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Actinobacteria* и *Firmicutes* (Singh et al., 2021; Kaltenpoth et al., 2025). Локализация симбионтов может быть эпикутанулярной

(Janke et al., 2022a), кишечной (Zhang et al., 2022) и внутриклеточной (в том числе, в специализированных клетках бактериоцитах) (Luan, 2024). Культивируемая и некультивируемая кишечная микробиота детально описана у многих насекомых, таких как *Drosophila melanogaster* Meigen (Yu, Iatsenko, 2025), *Limantria dispar* L. (Bai et al., 2023), разных видов кровососущих комаров семейства Culicidae (Liu et al., 2024), представителей инфраотряда Isoptera (Dar et al., 2024), в том числе и у исследуемых нами *Galleria mellonella* L. (Allonsius et al., 2019; Emery et al., 2021) и *Leptinotarsa decemlineata* Say (Wang et al., 2020a; Kang et al., 2021; Stara, Hubert, 2023). Физиологическое влияние симбиотических бактерий на жизнеспособность хозяина может варьировать от паразитического до комменсального и мутуалистического из-за динамичной внешней среды (Kikuchi et al., 2016), изменений в процессе онтогенеза (McCutcheon et al., 2019) или при патогенезах (Stevens et al., 2021).

Микробные симбионты у насекомых могут быть как факультативными, так и облигатными. Например, у *Acyrtosiphon pisum* Harris в бактериоцитах описаны облигатные эндосимбиотические бактерии рода *Buchnera*, у *Bemisia tabaci* Gennadius обитает облигатный симбионт рода *Portiera* (Luan, 2024). Приобретение таких симбионтов часто происходит вертикально – от родителей к потомству (Luan, 2024). Все насекомые несут факультативные симбиотические бактерии, которые не являются определяющим фактором ни для выживания хозяина, ни для его плодовитости и, как правило, неравномерно распределяются в популяциях конкретного вида (Łukasik, Kolasa, 2024). Факультативные симбионты могут передаваться горизонтально и вертикально (Hoffmann, Cooper, 2025).

### **Роль кутикулярного микробиома в защите от грибных инфекций**

Экзоскелет многих насекомых является субстратом, который могут колонизировать различные микроорганизмы. Однако, на сегодняшний день известно сравнительно немного о составе, стабильности и вкладе кутикулярных

микробных сообществ в жизнедеятельность насекомых. Чаще всего кутикула представляет собой неблагоприятную среду для микробов, однако, в локальных микросредах, в том числе в местах, которые могут предпочитать грибы, таких как влажные межсегментные области, а также ротовая полость и анальное отверстие, отмечается более высокая плотность микроорганизмов (Goettler et al., 2022; Janke et al., 2022a; Kaltenpoth et al., 2025). Одна из доминирующих бактерий, выделенная с поверхности кутикулы *Bombyx mori* L., *Mammaliicoccus sciuri* (= *Staphylococcus sciuri*), может полностью подавлять прорастание спор *M. robertsii* и *B. bassiana*, в основном за счет выделения противогрибкового пептида лизоцима (Zhao et al., 2024). Различные G<sup>+</sup> и G<sup>-</sup> бактерии, выделенные с эпикутикулы взрослых особей *Drosophila*, оказывают значительное ингибирующее воздействие на прорастание спор *M. robertsii* и *B. bassiana*, и устойчивость к грибам зависит от плотности бактерий на кутикуле (Hong et al., 2022). Так же бактерии *Pseudomonas* и *Serratia*, доминирующие на поверхности кутикулы японского соснового лубоеда *Monochamus alternatus* Hope, могут полностью подавлять прорастание спор *B. bassiana* (Deng et al., 2022). В работе А. В. Толедо с соавторами (Toledo et al., 2011) с кутикулярной поверхности кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* De Long and Wolcott и цикадки *Delphacodes kuscheli* Fennah были выделены антагонисты *B. bassiana*, среди них оказались такие бактерии как *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. lichemiformis* и *B. subtilis*.

На кутикуле многих видов муравьёв-«листорезов» *Acromyrmex* (*A. echinator*, *A. octospinosus* и *A. volcanus*) развиваются бактерии *Pseudonocardia*, которые подавляют развитие *M. anisopliae* (Bruner-Montero et al., 2021). Удаление биопленок *Pseudonocardia* с кутикулы с помощью антибиотиков значительно повышает восприимчивость муравьёв к энтомопатогенным грибам.

## Роль кишечной микробиоты в защите от грибных инфекций

Кишечные бактерии как правило напрямую не взаимодействуют с энтомопатогенными грибами, однако также могут повышать устойчивость к ним. Исследования кишечных бактерий пустынной саранчи *Schistocerca gregaria* Forsk. выявили их противогрибные свойства. В кишечнике и фекальных массах саранчовых был обнаружен ряд соединений, секретируемых бактериями *Pantoea*, способных подавлять прорастание конидий *M. anisopliae* (Dillon, Charnley, 2002). Из кишечника цикады *Amrasca biguttula* Ishida был выделен штамм *Bacillus pumilus*, который проявлял противогрибковую активность в отношении ряда энтомопатогенных грибов, включая *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Cordyceps fumosorosea* и *Lecanicillium lecanii* (Sivakumar et al., 2017). Из кишечника колорадского жука выделены бактерии родов *Pseudomonas*, *Enterobacter* и *Serratia*, проявляющие антагонизм по отношению к *B. bassiana* (Blackburn et al., 2008).

Антагонизм между энтомопатогенными грибами и кишечными бактериями насекомых наиболее выражен при пероральном пути заражения. Например, эксперименты с жуком *M. alternatus* (Deng et al., 2022) и личинками *Delia antiqua* Meig (Zhou et al., 2021) показали, что насекомые с искусственно удалённой микробиотой (аксенные) обладают повышенной чувствительностью к грибным патогенам по сравнению с особями, сохранившими естественное микробное сообщество. Аналогичный эффект выявлен у рыжего таракана *Blattella germanica* L.: угнетение кишечной микрофлоры антибиотиками увеличивало чувствительность насекомых к заражению грибом *M. anisopliae* при пероральном инфицировании (Zhang et al., 2018). Авторы делают вывод о возможности биологического контроля рыжего таракана на основе комбинирования энтомопатогенных грибов с антибиотиками.

## **Роль облигатных внутриклеточных симбионтов в защите от грибных инфекций**

Самые изученные и широко распространенные облигатные внутриклеточные симбионты насекомых присутствуют в классах Alphaproteobacteria (*Wolbachia* и *Rickettsia*) и Gammaproteobacteria (например, *Sodalis*, *Buchnera*, *Nardonella*, *Arsenophonus* и других родов), Bacteroidia (например, *Karelsulcia*, *Blattabacterium*, *Shikimatogenerans*, *Cardinium* и другие) и Mollicutes (род *Spiroplasma*) (Kaltenpoth et al., 2025).

Бактерия *Wolbachia* является примером симбионта, обладающего разнообразными способами взаимодействия с хозяином, в частности меняющего его метаболизм (Russell et al., 2023) и репродуктивные функции (Katsuma et al., 2022). Важное полезное взаимодействие *Wolbachia* с хозяином это способность подавлять патогены как вирусной (O'Neill et al., 2019), так и грибной этиологии, тем самым обеспечивая хозяину значительное преимущество в плане приспособленности (Perlmutter et al., 2025).

Способность симбионтов *Rickettsia* и *Spiroplasma* усиливать устойчивость к грибным патогенам была продемонстрирована у гороховой и зерновой тлей *A. pisum* и *Sitobion avenae* Fabricius (Łukasik et al., 2013). У жуков *Lagria villosa* Fabricius грибные инфекции предотвращаются симбионтами *Burkholderia*, которые вырабатывают различные противомикробные соединения (Janke, 2022b). Эндосимбионт *Sodalis pierantonius*, ассоциированный с зерновым долгоносиком *Sitophilus oryzae* L., синтезирует витамины и незаменимые аминокислоты для жука. В частности, ароматические аминокислоты опосредуют ключевые физиологические процессы — усиление меланизации и утолщение кутикулы у взрослых особей, что повышает устойчивость жуков к обезвоживанию и грибным патогенам (Kanyile et al., 2022, 2023).

### 1.2.2. Бактерии, осложняющие и усиливающие развитие микозов

Синергетические взаимодействия между энтомопаразитическими грибами и энтомопатогенными бактериями, такими как *Bacillus thuringiensis*, давно известны и продолжают оставаться предметом интенсивного изучения в контексте разработки стратегий биологического контроля (Wraight, Ramos, 2017a; Aynalem et al., 2022). В том числе описаны некоторые иммуно-физиологические механизмы этого синергизма (Yaroslavtseva et al., 2017). Что же касается вторичных бактериальных инфекций, вызываемых симбиотическими бактериями хозяев при развитии микозов, подобные исследования активно проводятся лишь последние 10 лет.

Установлено, что при колонизации грибом кутикулы и гемоцели насекомого наблюдается увеличение численности кишечных бактерий, включая доминирующие таксоны, что подтверждается данными исследований на разных таксонах насекомых (Wei et al., 2017; Xu et al., 2019; Bai et al., 2023). Вэй с соавторами (Wei et al., 2017) показали, что инфицирование *B. bassiana* через кутикулу снижает в кишечнике имаго комаров *Anopheles* экспрессию НАДФН оксидаз (DUOX) и антимикробных пептидов, что приводит к повышению численности условных патогенов *Serratia marcescens*. Последние проникают через кишечник в гемоцель, ускоряя развитие патогенеза и приводя к быстрой гибели от сочетанной инфекции. Сюй с соавторами (Xu et al., 2019) показали подобные эффекты у жуков-короедов *Dendroctonus valens* LeConte, но в кишечнике повышалась численность протеобактерий *Erwinia*. Скармливание этих бактерий аксенным насекомым приводило к повышению восприимчивости к *B. bassiana*. У *G. mellonella* повышалось относительное обилие бактерий семейства *Enterobacteriaceae* после заражения *B. bassiana*, а их скармливание насекомым приводило к усилению гибели от гриба (Polenogova et al., 2019). У *Vastrocera dorsalis* Hend при заражении *M. robertsii* повышалась численность бактерий *Lactococcus lactis* (Gichuhi et al., 2020). Сходные эффекты наблюдались в системе

*Lymantria dispar* L. – *B. bassiana* – разные таксоны кишечных бактерий (Bai et al., 2023). Таким образом, взаимодействие между грибом, микробиотой хозяина и иммунитетом самого хозяина представляет собой систему прямых и обратных связей, которые могут усиливать патологический процесс. Механизмы синергизма этих взаимодействий могут включать влияние метаболитов гриба на кишечный иммунитет и, следовательно, численность и композицию кишечной микробиоты хозяина, что приводит к развитию дисбактериоза и пролиферации условно-патогенных микроорганизмов и способствует осложнению микоза (Wei et al., 2017; Wang et al., 2023b).

Следует отметить, что грибы могут препятствовать размножению симбиотических бактерий хозяина с помощью вторичных метаболитов (Fan et al., 2017; Sun et al., 2022), чтобы избежать конкуренции с бактериями и успешно завершить жизненный цикл. Например, при добавлении в питательную среду экстракта хрущака малого *Tribolium castaneum* Herbst энтомопатоген *Aspergillus parasiticus* вырабатывает бромистое соединение (2-(4-бромфенил)-2-оксоэтилбензоат), подавляющий экспрессию факторов вирулентности и формирование биоплёнок, у *Pseudomonas aeruginosa* (Cartagena et al. 2014).

Различные грибы, среди которых *B. bassiana*, вырабатывают вторичный метаболит ооспореин, относящийся к 1,4-бибензохинонам и обладающий цитотоксическими свойствами (Alurappa et al. 2014). Противомикробная активность ооспореина позволяет *B. bassiana* минимизировать конкуренцию со стороны бактерий после гибели хозяина. Это способствует более эффективному преобразованию ресурсов хозяина в биомассу гриба и продукцию конидий (Fan et al., 2017). Еще одним фактором, способствующим успешному развитию гриба, является опосредованное взаимодействие с иммунитетом хозяина. Как показано в работе Ванга и соавторов (Wang et al., 2023a), микоз вызывает экспрессию антибактериальных пептидов в гемоцеле чешуекрылых (*Helicoverpa armigera* Hübner) через повышение уровня 20-гидроксиэкдизона и активации пути Toll. Это подавляет бактериальных конкурентов, позволяя грибу завершить свой онтогенез.

Несмотря на прогресс в подобных исследованиях, механизмы взаимодействия энтомопатогенных грибов с микробиомом насекомых остаются малоизученными особенно при внешних стрессовых воздействиях.

### **1.2.3. Вклад факторов среды в развитие грибных и сочетанных инфекций**

Влияние факторов окружающей среды на инфекции у насекомых многогранно и включает в себя взаимное влияние между патогенами, их хозяевами и окружающей средой. Успешность развития грибной инфекции у насекомых во многом определяется физиологическим состоянием хозяина (Ma et al., 2024). Как правило, для успешного инфицирования и успешного завершения жизненного цикла грибов требуются очень высокие концентрации конидий (Jaronski, 2010). Однако внешние факторы, в том числе сопутствующие инфекции ослабляют организм насекомых, что позволяет грибу развиваться даже при минимальных дозах конидий (Kryukov et al., 2018c). Восприимчивость насекомых к грибам способны усиливать такие факторы, как субоптимальная для хозяина температура и токсины различного происхождения.

Температура является одним из важнейших факторов, влияющих на развитие микозов и бактериозов у насекомых (Bidochka et al., 2002; Carrizo et al., 2023). Температурные условия влияют как на рост микроорганизмов, так и на иммунные и поведенческие реакции насекомых (Wojda, 2017a). Энтомопатогенные аскомицеты обычно оптимально растут при температуре 20–30 °C в то время как экстремальные температуры могут замедлить их рост или инактивировать споры (Tkaczuk, Majchrowska-Safaryan, 2023). Экстремальные температуры могут активировать иммунный ответ и усиливать физиологические процессы у насекомых (Wojda, 2017a). Рядом авторов было отмечено, что тепловой стресс индуцирует выработку белков теплового шока (Wojda, 2017a; Li et al., 2022; Xiao et al., 2024). Эти белки, выступая в роли шаперонов и сигнальных молекул, активируют иммунно-сигнальные пути и стимулируют синтез антимикробных

пептидов (Li et al., 2022). В дополнение к этому, влияние на иммунный ответ может оказывать окислительный стресс, который возникает в результате дисбаланса между выработкой активированных кислородных метаболитов (АКМ) и доступной антиоксидантной защитой от них (Chaitanya et al., 2016). Высокие температуры увеличивают количество АКМ, которые могут повреждать клетки и ослаблять иммунитет насекомых (González-Tokman et al., 2025). Кроме того, АКМ необходимы для контроля микроорганизмов, связанных с кишечником и подавления патогенов (Bai et al., 2021). Изменение гомеостаза АКМ в организме может привести к неконтролируемому размножению бактерий и снижению выживаемости насекомых (Bai et al., 2021).

Однако, реакции организма насекомых на тепловой стресс не всегда универсальны и могут различаться в зависимости от вида и стратегии жизненного цикла. В некоторых случаях повышение температуры усиливает иммунный ответ, например у *Anopheles albimanus* Wiedemann (Condé et al., 2021), *G. mellonella* (Wojda, Taszłow, 2013), *Apis mellifera* L. (Li et al., 2022), но может оказывать и иммуносупрессивное действие. Например, *Melanoplus sanguinipes* Fabricius, выращенные при более высоких температурах, более восприимчивы к заражению *B. bassiana*, что связано со снижением уровня меланизации и активности профенолоксидазы (Srygley, Jaronski, 2022).

Низкие температуры так же способны существенно модифицировать характер иммунного ответа у насекомых (Salehipour-Shirazi et al., 2017, El-Saadi et al., 2023). Холодовой стресс индуцирует физиологическую перестройку, в ходе которой иммунная система достигает нового баланса с иными функциями организма. Последующее согревание, в свою очередь, может служить сигналом для активации иммунного ответа, направленного на подавление патогенов, чья активность возросла в период сниженной иммунной активности при низких температурах (El-Saadi et al., 2023). Холодовая пауза не приводит к полному подавлению иммунитета (Řeřicha et al., 2021), однако сопровождается значительной перестройкой микробного сообщества, дисрегуляцией иммунных

реакций и, как следствие, может привести к повышению восприимчивости к патогенам (Ferguson et al., 2018). Однако ключевой вопрос о том, как температура модулирует взаимодействие между патогенными грибами и симбиотическими бактериями в организме хозяина, по-прежнему не имеет ответа.

Кроме абиотических факторов на течение инфекций могут оказывать влияние природные или синтетические токсины. Химические пестициды часто вызывают общее подавление иммунного ответа насекомых. Например, у рабочих особей и маток *A. mellifera*, подвергшихся воздействию сублетальных доз неоникотиноидов тиаклоприда или тиаметоксама, наблюдалось снижение количества гемоцитов, выраженное подавление реакции инкапсуляции и снижение антимикробной активности (Brandt et al., 2017). Фосфорорганические соединения подавляют выработку АКМ у *D. melanogaster* (Chmiel et al., 2019). Было доказано, что гербицид глифосат у медоносных пчёл подавляет экспрессию генов, отвечающих за индукцию АМП, а также нарушает окислительно-восстановительные реакции, необходимые для меланизации (Motta et al., 2022).

Ряд исследований посвящён изучению синергизма между инсектицидами и грибными патогенами (Ali et al., 2017; Vivekanandhan et al., 2022). Например, Цянь и соавторы (Qian et al., 2023) выявили, что комбинированное действие *M. anisopliae* с хлорантранилипролом или авермектинами на личинках *Neortia vitessoides* Moore приводит к резкому повышению активности антиоксидантных ферментов, что указывает на стресс, вызванный повышенной продукцией АКМ. В долгосрочной перспективе иммунная система перестает функционировать должным образом и активность ферментов снижается, что приводит к смерти хозяина.

Синергизм энтомопатогенных грибов и инсектицидов во многом обусловлен физиологическими нарушениями у насекомых, включая дисфункцию пищеварения и задержку развития (Akhanayev et al., 2017). В исследованиях Томиловой О. Г. и Крюкова В. Ю с соавт. установлено, что природные и полусинтетические инсектициды усиливают вирулентность грибов *M. robertsii* и

*B. bassiana* за счёт подавления защитных механизмов личинок колорадского жука (Tomilova et al., 2016; Kryukov et al., 2018b).

Важным токсикантом природного происхождения является тенуазоновая кислота (TeA) – микотоксин, вырабатываемый различными видами фитопатогенных грибов рода *Alternaria*. Салимовой Д. было показано, что TeA обладает ларвицидной активностью в отношении таких насекомых как *G. mellonella* и *Zophobas morio* Fabricius (Salimova et al., 2021). Экстракты из культур *Alternaria alternata* ингибировали ацетилхолинэстеразы и проявляли инсектицидную и иммуносупрессивную активность в отношении хлопковой совки *Spodoptera litura* Fabricius (Kaur et al., 2015). На сегодняшний день влияние этого токсиканта слабо изучено и требует дальнейших исследований.

Среди биологических способов контроля численности насекомых используются паразитоиды родов *Encarsia*, *Habrobracon*, *Trichogramma* и ряд других (Koller et al., 2023). В яде паразитоидов содержатся вещества с антимикробными свойствами, которые способны угнетать микрофлору хозяина (Weiss et al., 2014). Помимо этого, сложные по своему составу яды паразитоидов, оказывают влияние на клеточный и гуморальный иммунный ответ своих хозяев, чаще подавляя защитные реакции (Vecchimanzi et al., 2017).

Следует отметить, что экспериментальные работы по влиянию средовых факторов на вовлечение симбиотических бактерий в развитие микозов и сочетанных инфекций единичны. Например, было установлено, что ассоциированная с *Plagioderia versicolora* Laicharting микробиота повышает устойчивость к двойному стрессу, вызванному энтомопатогенным грибом *Aspergillus nomius* и гербицидом глифосат (Zhang et al., 2024). В работах нашего коллектива было показано, что обработка личинок комара *Aedes aegypti* L. полулетальными дозами авермектинов вызывает структурные перестройки микробного сообщества, снижает обилие антагонистов энтомопатогенных грибов (*Microbacterium*) тем самым способствуя ускоренному проникновению гиф *M. robertsii* в гемоцель личинок и их быстрой смерти (Noskov et al., 2021).

Исследование о влиянии температуры на выживаемость и микробиом *Phthorimaea absoluta* Meyrick при заражении *Metarhizium anisopliae* показало, что гриб нарушает защитные и физиологические функции насекомого, влияя на состав его микробиома и увеличивая бактериальную нагрузку (Maingi et al., 2023). Выявлен ряд эффектов в развитии микоза *C. militaris* в личинках воцинной огневки в зависимости от температур (Kryukov et al., 2018a). В частности развитие септицемий при микозе зависело от концентрации бластоспор *C. militaris* и проявлялось при экстремально низких для хозяина температурах (5°C), а наиболее успешно микоз реализовывался при 15°C. Установлено, что яд эктопаразитоида *H. hebetor* оказывает супрессивное действие на клеточный иммунитет личинок воцинной огневки и резко повышает их чувствительность к энтомопатогенным грибам *Beauveria*, *Metarhizium* и *Isaria* (Kryukov et al., 2018d), однако личинки сохраняют резистентность к условным патогенам (грибы и бактерии) (Kryukov et al., 2017; 2022). Механизмы данного явления остаются не изученными.

### **1.3. Механизмы резистентности насекомых к бактериальным и грибным инфекциям**

#### **1.3.1. Кутикула и кишечник как основные барьеры для проникновения патогенов**

Кутикула – это защитный слой, который служит первым барьером от проникновения энтомопатогенных грибов в организм насекомого. Состав кутикулы определяет эффективность прорастания конидий энтомопатогенных грибов (Ortiz-Urquiza and Keyhani, 2013). Алкены и жирные кислоты на поверхности кутикулы могут оказывать фунгистатическое воздействие (Smith, Grula, 1982; Pedrini et al., 2007; Gołębiowski et al., 2015). Кроме того, противомикробные вещества могут вырабатываться экзокринными железами на поверхность тела (Foster, Casas, 2025; Abbot, 2022; Vesović et al., 2022).

Разрушение кутикулы (физическое или вызванное патогеном) индуцирует синтез меланина через активацию фенолоксидазы — медьсодержащего фермента

класса оксидоредуктаз. Промежуточные продукты фенолоксидазного каскада – хиноновые и семихиноновые радикалы, супероксид анион и др. подавляют развитие патогенных микроорганизмов (Marieshwari et al., 2023; Ma et al., 2024). В ряде работ показана взаимосвязь между устойчивостью насекомых разных таксонов к патогенам и степенью меланизации их кутикулы (Yassine et al., 2012; Dubovskiy et al., 2013b; Baker et al., 2023). Следует отметить, что степень меланизации может зависеть от присутствия внутриклеточных бактериальных симбионтов, как показано для долгоносика *S. oryzae* и его эндосимбионта *S. pierantonius* (Kanyile et al., 2022, 2023).

Важно отметить, что при адгезии и проникновении патогенов через кутикулу, начинается синтез АМП в разных тканях насекомых (в том числе в гиподерме) и в кутикулярных слоях детектируются АМП (Brey et al., 1993; Mallick, Eleftherianos, 2024). Вышесказанное свидетельствует о том, что кутикула не просто механический барьер, но также орган иммунитета, способный предотвращать проникновение патогенов.

В ходе длительной эволюции у насекомых выработались механизмы защиты кишечника от проникновения чужеродных микроорганизмов, в том числе физические барьеры и иммунные реакции. Со стороны физических барьеров защиту обеспечивает главным образом перитрофическая мембрана, имеющая в своем составе хитин и белки (Hegedus et al., 2009), а также слизистый слой, который представляет собой структуру из гликозилированных белков (Miguel-Aliaga et al., 2018). Многочисленные исследования показали, что иммунная защита кишечника активируется весьма быстро, когда эпителиальные клетки кишечника подвергаются воздействию патогенов (Wei et al., 2017; Chen, Lu, 2018; Zeng et al., 2022). Кроме того, к иммунному ответу может приводить и нарушение микробного гомеостаза в кишечнике (Zhang et al., 2017; Sarvari et al., 2020). Первой линией защиты считаются механизмы, связанные с выработкой АКМ (система двойной оксидазы), которые направлены на уничтожение патогенов (Xiao et al., 2017). Второй линией защиты является выработка АМП против

грамотрицательных и грамположительных бактерий и дрожжевых грибов (Malassigné et al., 2021). В регуляции кишечного иммунитета также задействован сигнальный путь янус-киназы JAK/STAT, который участвует в продукции АМП и контролирует дифференцировку стволовых клеток кишечника (Bang, 2019). Таким образом, иммунная защита кишечника играет особую роль в сопротивлении и уничтожении чужеродных патогенов, а также в поддержании стабильности внутренней среды кишечного микробиома.

### **1.3.2. Реакции иммунитета**

#### **1.3.2.1. Клеточные реакции - инкапсуляция и фагоцитоз**

Основные реакции клеточного иммунного ответа включают в себя такие стадии как распознавание, активацию и сигнализацию, и устранение угрозы. Защитные механизмы насекомых различаются в зависимости от стадии заражения. Согласно современным транскриптомным исследованиям, присутствие конидий *Metarhizium acridum* на кутикуле *Locusta migratoria* L. уже индуцирует активацию ряда генов иммунитета в гемоцитах (Zhang et al., 2020). Последующие реакции клеточного иммунитета, такие как фагоцитоз, гранулообразование и инкапсуляция, происходят сразу после проникновения патогена в гемоцель (Wojda, 2017b; Stanley et al., 2023; Ma et al., 2024).

Гемоциты с помощью рецепторов (PRRs) (Wang et al., 2019) распознают молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами (PAMPs) (Silva-Gomes et al., 2014) (см. раздел 1.3.2.2.). После связывания с соответствующими лигандами эти рецепторы запускают сигнальные процессы, которые приводят к процессам фагоцитоза и инкапсуляции (Wang et al., 2019).

Фагоцитоз – это защитная реакция, при которой связывание мишени с ее рецептором побуждает иммунную клетку образовывать фагосому (Stuart, Ezekowitz, 2008). Гемоциты фагоцитируют различные мишени, включая бактерии, дрожжи, апоптотические тельца и абиотические частицы, такие как синтетические шарики (Stuart, Ezekowitz, 2008). Этот процесс эффективно устраняет бактерии —

например, плазматочиты *Manduca sexta* L. фагоцитируют до несколько сотен бактериальных клеток (Dean et al., 2004). Однако в случае энтомопатогенных грибов (*Beauveria*, *Metarhizium*) фагоцитоз менее результативен: гифальные тела, поглощённые гемоцитами, способны прорасти, формируя новые гифы (Bidochka et al., 2010).

Инкапсуляция — защитный механизм насекомых, направленный на изоляцию и уничтожение чужеродных объектов в полости тела. Этот процесс включает формирование капсулы из нескольких слоев гемоцитов и меланина (Dubovskiy et al., 2016). Инкапсуляция может защитить от крупных объектов, превышающих размеры самих гемоцитов, и от объектов поменьше, сопоставимых с гемоцитами, так называемое гранулообразование (Satyavathi et al., 2014). При грибных инфекциях (*Beauveria*, *Metarhizium*) инкапсуляция гифальных тел задерживает и может предотвратить развитие микоза при небольших инфекционных нагрузках (Chouvenc et al., 2009). Однако при высоких дозах ресурсов хозяина на инкапсуляцию не хватает и грибы могут прорасти из капсул благодаря гидролазам и токсинам, разрушающим гемоциты (Butt et al., 2016; Lu et al., 2021; Smith et al., 2022). Инкапсуляция подавляет развитие паразитоидов (яйца, личинки), однако их выживаемость также зависит от численности в хозяине, а компоненты ядов паразитоидов снижают интенсивность инкапсуляции (Yang et al., 2021; Dolezal, 2023).

### **1.3.2.2. Гуморальный иммунитет**

#### **Имуносигнальные пути**

Для обнаружения патогенов у насекомых в организме присутствует определенный набор рецепторов, которые способны распознавать патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP), такие как липополисахариды, липотейхоевые кислоты, липопротеины, пептидогликаны,  $\beta$ -1,3-глюканы и другие молекулы патогенов (Wang et al., 2019; Zhao et al., 2023). Грамотрицательные бактерии определяются рецепторами типов PGRP-LC –LE и SB (Neyen et al., 2012)

грамположительные бактерии определяются типами рецепторов PGRP-SA и SD (Iatsenko et al., 2016), а также GNBP1. Рецепторы белков связывания с грамотрицательными бактериями (GNBP-3 или  $\beta$ GRP) также распознают  $\beta$ -1,3-глюканы грибов (Stączek et al., 2021). Важно отметить, что активация иммуносигнальных путей происходит не только через распознавание компонентов клеточных стенок патогенов, но и через индукцию разных компонентов сигнальных путей паттернами, ассоциированными с разрушением тканей хозяина, белками и вторичными метаболитами патогенов, компонентами ядов животных (DAMP) (Krautz et al., 2014). DAMP могут активировать сериновые протеиназы, например, Persephone (в пути Toll) или PGRP-LC (в пути IMD) (Nakano et al., 2023). Индукция сигнальных путей также может происходить из-за метаболических изменений, стрессовых факторов или старения (Adamo, 2017; 2022; Lennicke, Cochemé, 2020).

Основными иммуносигнальными путями насекомых являются Toll, Imd (иммунодефектный путь) с ветвью MAPK, а также JAK/STAT (Gay et al., 2014; Yu et al., 2022; Zhang et al., 2023). Toll связан с защитой от грамположительных бактерий и грибов, IMD – преимущественно с защитой от грамотрицательных бактерий, а Jak-Stat – от разных групп патогенов, в том числе вирусов (Yu et al., 2022; Zhang et al., 2023).

Запуск каскада передачи сигнала по Toll-пути происходит при индукции рецепторов (PGRP-SA, -SD и  $\beta$ GRP), которые приводят к запуску каскада сериновых протеиназ (ModSP, Spherolide, SPE и др.), приводящих к расщеплению компонента proSpatzle и активации белка Spatzle (Ferrandon et al., 2007; Valanne et al., 2022). Следом активируется сигнальный комплекс TISC (Toll-induced signaling complex), в состав которого входят белки Toll-receptor, MyD88, Tube и Pelle, и запускается фосфорилирование и расщепление белка Cactus – ингибитора NF- $\kappa$ B-подобного транскрипционного фактора Dorsal/Dif, который проникает в ядро и индуцирует экспрессию генов антимикробных пептидов (Ferrandon et al., 2007; Zhou et al., 2021).

Активация передачи сигнала по иммунному пути Imd индуцируется при активации пептидогликанами грамотрицательных бактерий рецепторов PGRP-LC или PGRP-LE, белка IMD, в результате происходит фосфорилирование NF-κB-подобного транскрипционного фактора Relish через активацию киназы TAK1 (TGF-β-activated kinase 1), IκB-киназного комплекса и индукции/супрессии ряда других вспомогательных компонентов (Kleino, Silverman, 2014). Фактор Relish запускает экспрессию АМП в ядре (Sarvari et al., 2020). Отдельной ветвью IMD пути является путь MAPK, связанный со стресс-ответом, заживлением ран и окислительно-восстановительными процессами, в том числе активирующий экспрессию двойной оксидазы (Duox) (Xiao et al., 2017).

Четырьмя основными компонентами сигнального пути JAK/STAT являются лиганд Unpaired (Upd), рецептор Domeless (Dome), тирозинкиназа Hopscotch (Hop) и транскрипционный фактор STAT (Stat92E) (Bang, 2019). К негативным регуляторам относятся белки семейства SOCS, а также ингибиторы активированных белков STAT (PIAS), которые поддерживают гомеостаз клеток, регулируя сигнальный каскад (Bang, 2019). Путь JAK/STAT формирует сложные, специфические и универсальные реакции на вирусные инфекции путём синтеза цитокинов (Bang, 2019). Путь связан с пролиферацией и дифференциацией гемоцитов и может влиять на продукцию АМП, поэтому также участвует в защите от бактериальных и гибных инфекций (Li, Jihu, et al., 2023; Zhao, Yu-Jie, et al., 2024)

Указанные компоненты сигнальных путей детально охарактеризованы в первую очередь для *D. melanogaster*. Что касается *L. decemlineata* и *G. mellonella*, функционирование компонентов сигнальных путей изучено гораздо слабее.

### **Антимикробные пептиды**

Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой низкомолекулярные пептиды, которые играют важную роль во врожденном иммунитете хозяина

против широкого спектра микроорганизмов, включая бактерий, грибов, паразитотодов, нематод и вирусов (Bin Hafeez et al., 2021).

По данным С. В. Баландина и Т. В. Овчинниковой (2016) у АМП животного происхождения выделяют три основных класса: 1) цистеинсодержащие пептиды, стабилизированные внутримолекулярными дисульфидными связями; 2) линейные  $\alpha$  спиральные пептиды; 3) линейные пептиды, обогащенные остатками определенных аминокислот. Дополняют эту классификацию АМП смешанного типа, содержащие домены с различающейся структурой (Баландин, Овчинникова, 2016; Ramazi et al., 2022).

К цистеинсодержащим АМП, стабилизированным внутримолекулярными дисульфидными связями относятся дефензины, в состав которых входят от 34 до 51 аминокислотных остатков (Eleftherianos I. et al., 2021). Они обнаружены у насекомых из отрядов двукрылые, жесткокрылые, полужесткокрылые, перепончатокрылые, прямокрылые (Wojda, 2020). Среди основных свойств дефензинов можно выделить антибактериальную активность преимущественно для грамположительных бактерий. Они слабо активны против грамотрицательных бактерий и эукариотических клеток (Bin Hafeez et al., 2021). Хотя, такой представитель семейства дефензинов как дрозомидин, выделенный у *D. melanogaster* проявляет выраженную фунгицидную активность, но не действует на бактерии или клетки животных (Zhang, Zhu, 2009). Танатин — обнаружен у клопа *Podisus maculiventris* Say, катионный гидрофобный пептид из 21 аминокислоты проявляет широкую цитотоксичность против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов (Rouhani et al., 2022). Выделенный из *G. mellonella* галлеримицин обладает фунгистатическими свойствами, в том числе против *M. anisopliae s.l.* (Schuhmann et al., 2003). Другой цистеинсодержащий АМП *G. mellonella* – галиомицин – также активен против грибов, но не обладает антибактериальной активностью (Lee et al., 2004).

К линейным  $\alpha$ -спиральным АМП относятся в первую очередь цекропины — катионные пептиды длиной 35–39 аминокислот, описанные у представителей чешуекрылых и двукрылых (Wojda, 2020). Эти пептиды эффективны против грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов, опухолевых клеток, простейших, вирусов и нематод (Баландин, Овчинникова, 2016; Bin Hafeez et al., 2021).

К классу линейных АМП, обогащенных остатками определенных аминокислот чаще всего относят пептиды с высоким содержанием пролина или глицина, не имеющие упорядоченной пространственной структуры (Баландин, Овчинникова, 2016; Wojda, 2020). Структурно эти пептиды делятся на два подсемейства. К первому относятся металъниковины, пиррокоридин, дрозидин, формидин и гелиидин. Второе подсемейство составляют абаидины, лебидины и мечниковин (Баландин, Овчинникова, 2016). Линейные АМП многочисленны по своему функциональному разнообразию, например, мечниковин из *D. melanogaster* обладает комбинированной бактерицидной и фунгицидной активностью (Levashina et al., 1995; Perlmutter et al., 2024), аттаидины (чешуекрылые, жесткокрылые) имеют спектр действия против грамотрицательных бактерий (Fahmy et al., 2023). Гемиптеридин, найденный у насекомых отряда полужесткокрылых (Cociancich et al., 1994), обладает широким спектром, включая грамположительных бактерий. Гименоптеридин, обнаруженный у пчел (Casteels et al., 1993), диптеридины из *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, *Lucilia sericata* Meigen активны против грамотрицательных бактерий и гриба *Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge (Gordya et al., 2017). У *G. mellonella* обнаружено семейство защитных пептидов гловеридов, обогащённых остатками глицина, которые взаимодействуют с липополисахаридами и препятствуют образованию внешней мембраны бактерий (Vogel et al., 2011).

По способу воздействия на клеточную мембрану АМП можно классифицировать как мембранолитические и нелитические (Luo, Song, 2021). При первом способе к гибели клетки приводит разрушение цитоплазматической

мембраны патогена (Luo, Song, 2021). Существует три основных механизма этого процесса: образование цилиндрической поры (barrel stave), формирование тороидальной поры с участием липидов мембраны, а также покрытие поверхности по детергентному принципу (carpet model) (Kumar et al., 2018; Ahmed, Hammami, 2019). Например, цекропины действуют по последнему механизму, вызывая лизис бактериальных клеток (Peng et al., 2024).

Механизм нелитического действия АМП основан на изменении синтеза нуклеиновых кислот, белков, а также способности ингибировать процессы репликации, транскрипции и трансляции, разрушать органеллы или воздействовать на ферментную систему, нарушая клеточный цикл и энергетический обмен (Luo, Song, 2021). Например, пиррхорицин способен препятствовать правильному сворачиванию белков, что приводит к их накоплению и последующей гибели клеток (Graf, Wilson, 2019), аттацины способны ингибировать синтез белков наружной мембраны грамотрицательных бактерий (Fahmy et al., 2023).

Основной орган синтеза АМП – это жировое тело (Skowronek et al., 2021). Способностью к синтезу АМП в организме насекомых обладают гемоциты (Wojda, 2020). Кутикула и поверхностный эпителий также синтезируют АМП. Так в работах Цзоу и соавторов (Tzou et al., 2000, 2002) было продемонстрировано, что большинство защитных белков дрозофилы продуцируются эпителием проventрикулюса и среднего кишечника, и только дрозотин и дрозотицин образуются в кутикуле трахей.

### **Роль активированных кислородных метаболитов в регуляции иммунного ответа**

Термины "активные формы кислорода" (АФК) или «активные кислородные метаболиты» (АКМ) описывают группу молекул, содержащих по меньшей мере один атом кислорода и обладающих высокой реакционной способностью (Глухов и др., 2009). Они являются побочными продуктами метаболизма кислорода и

представляют собой химические соединения с одним неспаренным электроном, образующиеся из молекулярного кислорода, к основным из них относятся супероксид анион, гидроксильный радикал, алкоксильный и пероксильный радикалы, перекись водорода (Глулов и др., 2009, Belhadj Slimen et al., 2014).

АКМ играют важную роль в физиологии насекомых, регулируя ключевые процессы, такие как пролиферация клеток и метаболическая активность (Chaitanya et al., 2016; Towarnicki et al., 2020). Они также участвуют в иммунном ответе у насекомых, обладая цитотоксическим действием на микроорганизмы в процессе инкапсуляции и меланизации (Sajjadian and Kim, 2020; Dolezal, 2023).

Высокая продукция АКМ может привести к окислительному стрессу, что влияет на иммунный ответ, целостность ДНК и может приводить к гибели клеток, (Chesa, Aran, 2020), так как АКМ не обладают специфичностью и могут повреждать клетки собственного организма, если активность антиоксидантных соединений недостаточна (Chesa, Aran, 2020).

У насекомых АКМ образуется главным образом в процессе меланогенеза и инкапсуляции (Dolezal, 2023). Промежуточные продукты меланогенеза, такие как семихиноны, обладают двойным антимикробным действием через прямое подавление микроорганизмов за счёт их радикальной природы, либо через опосредованное воздействие за счёт образования перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) (Dolezal, 2023).

Другой важный путь продукции АКМ связан с НАДФН-оксидазным комплексом. Восстановление молекулярного кислорода до супероксида и/или перекиси водорода происходит при помощи семейств ферментов НАДФН-оксидазы (NOX1-5) и двойных оксидаз (DUOX1-2) (Moghadam et al., 2021). DUOX обеспечивает продукцию супероксид аниона и перекиси водорода в просвет кишечника, тем самым регулируя баланс бактериального сообщества и подавляя развитие патогенов (Yao et al., 2016; Xiao et al., 2017). Нокдаун DUOX или ее регулятора Mesh приводит к неконтролируемому размножению кишечной микробиоты и снижению выживаемости насекомых-хозяев (Xiao et al., 2017).

На этапе проникновения через кутикулу грибы экспрессируют секретлируемую каталазу-оксидазу, которая, вызывая окислительный стресс, способствует развитию инфекции (Zhang and Feng, 2018). В ответ для инактивации токсичных метаболитов насекомые также выделяют ферменты детоксикации, такие как супероксид-дисмутазы, каталазы, пероксидазы и глутатион S-трансферазы (GSTs) (Xiao et al., 2017; Vivekanandhan, Waheeb, 2025). Баланс между генерацией АКМ и антиоксидантной защитой у насекомых выполняет две ключевые функции – это подавление патогенов, проникших в организм и предотвращение оксидативного стресса, который может повредить ткани хозяина (Gretschner et al., 2016; Vivekanandhan, Waheeb, 2025).

Механизмы защиты патогенов от активации ФО каскада и выработки АКМ включают эффекторные белки *Metarhizium* и *Beauveria*, такие как Fkr1, которые способны блокировать активацию катепсинами сериновых протеаз CLIP-домена и изменять экспрессию генов-рецепторов в качестве компенсаторного механизма иммунного распознавания (Tang et al., 2025). Лакказа 2 *B. bassiana* ингибирует активацию ФО, снижает выработку АКМ, а также препятствует распознаванию иммунной системой, тем самым снижая экспрессию генов Toll-пути (Lu et al., 2021). Вторичные метаболиты *M. robertsii* демонстрируют сходные эффекты в подавлении иммунитета хозяина (Wang et al., 2012; Huang et al., 2020).

У ряда авторов описывается действие АКМ в качестве защиты от бактериальной или грибной инфекции у таких насекомых как *B. mori* (Ishii et al., 2008; Wang et al., 2020b), *D. melanogaster* (Ramond et al., 2021), *G. mellonella* (Dubovskii et al., 2010; Vorontsova et al., 2025), *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva (Diaz-Albiter et al., 2012), *Parasemia plantaginis* L. (Mikonranta et al., 2014). Описано действие АКМ у комара *Anopheles gambiae* Giles в качестве иммунного ответа против *Plasmodium* (Xiao et al., 2017) или бактерией *Enterobacter* из микробиоты кишечника (Cirimotich et al., 2011). Однако работы по продукции АКМ или экспрессии генов, связанных с данными процессами, при развитии

сочетанных инфекций или комбинированном действии патогенов и токсинов не многочисленны (Wei et al., 2017; Smith et al., 2021; Ma et al., 2021).

#### **1.3.2.4. Белки теплового шока и их роль в иммунном ответе насекомых**

Белки теплового шока (HSP) — это антистрессовые белки, которые продуцируются организмами в ответ на неблагоприятные условия окружающей среды (King, MacRae, 2015). HSP могут использоваться организмом в качестве молекулярных шаперонов для переноса внутриклеточных пептидных цепочек и распознавания денатурированных белков (Banfi et al., 2025).

У насекомых выявлены четыре основных семейства HSP: малые белки теплового шока (sHSP), HSP60, HSP70 и HSP90, которые являются первой линией клеточной защиты, предотвращающей необратимую денатурацию белков-субстратов, особенно когда клетки подвергаются стрессу (Banfi et al., 2025). Уровень экспрессии конститутивных HSP (HSC) находится на высоком уровне в нормальных условиях и не возрастает, либо возрастает слабо, при стрессе, тогда как уровень синтеза индуцируемых HSP зависит от стресса и значительно повышается при его действии (Farahani et al., 2020).

Малые белки теплового шока (sHSP) — консервативное семейство белков, связываются с денатурированными белками, предотвращая их агрегацию и способствуя последующему рефолдингу или деградации (Li et al., 2009). Помимо шаперонной активности, sHSP выполняют сборку цитоскелета, подавляют образование АКМ, а также обладают противовоспалительными и антиапоптотическими функциями (Li et al., 2009). Они изучены у представителей различных отрядов, таких как Diptera, Lepidoptera и Coleoptera (Moutaoufik, Tanguay, 2021).

Белок теплового шока Hsp90 выполняет молекулярный шаперонинг и регуляцию сигнальных путей, HSP60 обычно присутствует в цитоплазме и митохондриях и участвует в сворачивании и сборке белков, кодируемых ядерными генами, после попадания в митохондрии, а также в сворачивании,

сборке и транспорте белков, кодируемых самими митохондриями (Liang et al., 2023; Banfi et al., 2025).

Белок теплового шока Hsp70 играет центральную роль в фолдинге белков, а также действует как цитокин, участвуя в межклеточной коммуникации (Gu et al., 2012; Cheng et al., 2016). Внеклеточный Hsp70 может модулировать иммунные реакции и воспаление, аналогично классическим сигнальным молекулам (Banfi et al., 2025). Показано, что выработка Hsp70 у насекомых происходит при восстановлении после холодового или теплового шока, а не во время него, данные эффекты показаны на *D. melanogaster*, *Mamestra brassicae* L., *A. aegypti*, *Grapholita molesta* Busck, *G. mellonella*, *Spodoptera exigua* Hübner (Banfi et al., 2025).

Кроме того, такие семейства белков теплового шока как HSP70 и HSP90, могут негативно регулировать апоптоз, связываясь с участниками апоптотического каскада (Srinivasan et al., 2018). Например, Д. С. Неизвестный и Е. Ю. Яковлева (Neizvestny, Yakovleva, 2024) показали, что воздействие температурного стресса вызывает экспрессию HSP у *D. melanogaster*. Ванг и соавторами (Wang et al., 2007) было отмечено, что экспрессия HSP была значительно выше в мигрирующей фазе *L. migratoria*, чем в одиночной фазе, что позволяет предположить, что скученность способствует активации генов семейства HSP. Шим и др. (Shim et al., 2008) сообщили, что уровни экспрессии *sHSP* и *Hsp70* у личинок *Plodia interpunctella* Hübner повышались в ответ на паразитизм *H. hebetor*. У *Tribolium castaneum* Herbst воздействие бактериального липополисахарида вызывает скоординированную активацию HSP наряду с иммунными эффекторами, включая дефензин и тауматин (Altincicek et al., 2008). При инфекциях различной этиологии возможно, как подавление, так и усиление экспрессии генов HSP (Wrońska, Boguś, 2020; Guz et al., 2021; Banfi et al., 2025). Работы по экспрессии генов HSP у насекомых при развитии сочетанных инфекций, модулируемых средовыми факторами нам не известны.

### 1.3.3. Особенности функционирования иммуно-сигнальных путей у вошинной огневки

Вошинная огневка *G. mellonella* является модельным насекомым, которое широко используется для биологических анализов различных токсичных веществ и патогенных микроорганизмов (Wojda, 2017b, 2020; Curtis et al., 2022). Основные иммуно-сигнальные пути врожденного иммунитета у *G. mellonella* (Toll, Imd, JAK/STAT, MAPKs, система профенолоксидазы/меланизации) представлены теми же ключевыми компонентами, что и у *D. melanogaster* (Lionakis, 2011; Vogel et al., 2011; Sheehan et al., 2021). Так, геномные, транскриптомные и протеомные исследования вошинной огневки выявляют множество ортологичных компонентов иммуно-сигнальных путей (NF-κB/Relish-подобные факторы, STAT-подобные гены, киназы MAPK), а также репертуар АМП, соответствующий Toll и Imd каскадам (Lionakis, 2011; Vogel et al., 2011; Sheehan et al., 2021). *G. mellonella* экспрессирует набор около 20 АМП (например, галлеримицин, галиомицин, морицин, цекропины, дефензиноподобные пептиды) с дифференциальной индукцией в зависимости от патогена (Sarvari et al., 2020; Wojda, 2017b, 2020). В настоящее время продолжается активное изучение новых белков *G. mellonella* с защитными функциями (Kaczmarek et al., 2025; Kordaczuk et al., 2025).

Два наиболее изученных АМП вошинной огневки, галлеримицин и галиомицин, играют роль в иммунном ответе при микозах. Было установлено, что их продукция увеличивается после заражения грибами *Candida* и *Aspergillus* (Sheehan et al., 2018; 2021; Giammarino et al., 2024), а также энтомопатогенными аскомицетами *Beauveria* и *Metarhizium* (Dubovskiy et al., 2013a).

Вошинная огневка имеет температурный оптимум 37°C. Однако ее можно инкубировать в широком диапазоне температур 19-40°C, что позволяет изучать многие патогенные грибы и бактерии, чувствительные к температуре (Marena et al., 2025). При температурах ниже 18°C огневка впадает в факультативную диапаузу (Cymborowski, 2000), что также позволяет оценивать параметры иммунитета и восприимчивость к патогенам при данных покоящихся состояниях.

Успешность инфицирования огневки энтомопатогенными грибами зависит от концентраций спор грибов и развитии хозяина в определенном диапазоне температур (Kryukov et al., 2018c).

Действия внеклеточных протеаз, производимых патогеном в качестве факторов вирулентности, приводит к образованию фрагментов пептидов, которые служат «сигналом повреждения» и вызывают экспрессию генов, кодирующих защитные белки, среди которых есть противомикробные пептиды и специфический белок, называемый ингибитором металлопротеаз насекомых (IMPI) (Griesch et al., 2000). *G. mellonella* — первый животный организм, в котором был обнаружен специфический IMPI (Vogel et al., 2011; Wojda, 2017b). Этот белок может ингибировать грибные металлопротеазы, подобные термолизину, таким образом противодействовать факторам вирулентности грибов (Wojda, 2017b; Grizanova et al., 2021).

Известно, что токсины животного происхождения (яд паразитоида *H. hebetor*) существенно повышают восприимчивость воцинной огневки к энтомопатогенным грибам, приводя одновременно к повышению численности бактерий на кутикуле или в кишечнике огневки (Polenogova et al., 2019, Kryukov et al., 2022). Кроме того, некоторые грибные инфекции (например, *S. militaris*), могут приводить к септицимии и бактериальному распаду трупов (Kryukov et al., 2012). При этом реакции иммунитета при этих сочетанных патогенезах практически не изучались.

#### **1.3.4. Иммуно-сигнальные пути колорадского жука**

Колорадский жук (жесткокрылые: Chrysomelidae) широко известен как один из самых успешных в мире инвазивных насекомых-вредителей, наносящих ущерб пасленовым. Колорадский жук выработал устойчивость ко многим классам инсектицидов, в том числе к фосфорорганическим, карбаматным, пиретроидным и неоникотиноидным (Alyokhin, Rondon, Gao, 2022). Одними из наиболее распространенных патогенов колорадского жука являются грибы *Metarhizium* и

*Beauveria*, которые являются обычными обитателями картофельных агросистем, вызывая смертность жука на энзоотическом уровне (Alyokhin, Kryukov, 2022) и могут применяться против личинок вредителя в период вегетации картофеля (Wraight, Ramos, 2005; 2017b).

Функционирование иммунных сигнальных путей у *L. decemlineata* в ответ на микозы и бактериозы пока изучено слабо (Takov et al., 2022). В настоящее время собран и аннотирован геном колорадского жука (Schoville et al., 2018; Yan et al., 2023), а также проведены транскриптомные исследования, связанные с диапаузой (Lebenzon et al., 2018), холодным стрессом (Govaere et al., 2019), устойчивостью к инсектицидам (Kumar et al., 2014) и были проведены исследования локализации экспрессии генов в тканях (Wilhelm et al., 2025). Кроме того, были описаны изменения протеомного профиля личинок *L. decemlineata* при заражении *B. thuringiensis* (García-Robles et al., 2020).

Анализ геномных и транскриптомных данных, находящихся в свободном доступе (<https://cpb-atlas.uni-mainz.de/>, <https://www.kegg.jp/>), а также транскриптомных данных лаборатории экологической паразитологии (PRJNA1287592; Kryukov et al., в печати) показывает, что у колорадского жука представлены ключевые рецепторы, сигнальные компоненты и эффекторы, характерные для *Drosophila* и модельных жесткокрылых (*T. castaneum*, *T. molitor*). Среди генов распознавания выявлены гомологи пептидогликан-распознающих белков (PGRP-SA, -SC, -LA, -LC, -LE -LF),  $\beta$ -1,3-глюкан-распознающих протеинов ( $\beta$ GRP), С-лектинов, скавенджер рецепторов, галектинов, тиоэстер-содержащих протеинов. Выявлены гены CLIP-доменных сериновых протеиназ и их ингибиторов (серпины).

Детектированы все основные компоненты сигнальных каскадов Toll, IMD, MAPK и JAK-STAT. Из эффекторов детектированы гены профенолоксидаз и лакказ. Выявлено 17 генов АМП (аттацины (6), акалолептин (1), тенецин (1), холотрицины (2), лизоцимы (2), тауматины (4)). Детектировано 63 гена, связанных с окислительно-восстановительными процессами: НАДФ-Н оксидазы,

включая Дуох, синтаза оксида азота, пероксидазы, каталазы, СОД, ГСТ и др (Wilhelm et al., 2025; Kryukov et al., в печати).

Развитие и симптоматика микозов колорадского жука, вызываемых *Beauveria* и *Metarhizium* хорошо изучена. Симптомы микозов проявляются в виде меланотических пятен через 2-4 дня после местного применения *M. robertsii* или *B. bassiana*. Меланотические пятна представляют собой скопления гемоцитов под кутикулой и указывают на активное образование капсулы вокруг патогена (Vey, Fargues, 1977). На этой стадии гриб все еще может быть инактивирован, и насекомое может успешно линять и проходить метаморфоз. Далее (через 4-10 дней после инфицирования) патоген выходит из капсул и наблюдается циркуляция свободных гифальных тел в гемолимфе. При таком развитии патогенеза выживание личинок уже невозможно.

Проведенные ранее исследования (Yaroslavtseva et al., 2017; Tomilova et al., 2019; Kryukov et al., 2018b,c, 2022; Rotskaya et al., 2021) показали, что при развитии микозов, вызываемых *B. bassiana* и *M. robertsii* у колорадского жука, в гемолимфе, жировом теле и кутикуле происходят изменения активности фенолоксидазы, детоксицирующих и антиоксидантных ферментов, а также индукции экспрессии генов, кодирующих факторы транскрипции иммунных сигнальных путей (Dorsal, NF-kb, STAT), АМП, аттацинов, лектинов R-типа, одорант связывающих протеинов и белков теплового шока. Эти изменения зависели от видов и штаммов грибов и стадии развития хозяина и дополнительных факторов, в том числе при дополнительном инфицировании бактериями *B. thuringiensis* (Yaroslavtseva et al., 2017). У.Н. Рощкой и соавторами (Rotskaya et al., 2021) был идентифицирован белок рициновый-лектин колорадского жука, который может играть важную роль в противогрибковой защите насекомого. Было показано, что этот лектин подавляет прорастание конидий *B. bassiana* и *M. robertsii*.

Важно отметить, что роль бактериальных симбионтов колорадского жука в развитии микозов недостаточно изучена. Показано, что высоковирулентные

штаммы грибов зачастую не способны завершать жизненный цикл на насекомом: наблюдается не конидиальное спороношение, а бактериальный распад трупов (Kryukov et al., 2019). При развитии микозов ранняя гибель личинок часто сопряжена с развитием бактериозов, а гриб способен развиваться только при реализации длительного патогенеза (Крюков и др, 2007). Известно, что проникновение гриба через кутикулу может осложняться размножением симбиотических бактерий (в основном энтеробактерий) в гемолимфе (Приставка, 1967; Vey, Fargues, 1977). Вероятно, при остром развитии микоза бактерии конкурируют с грибами и могут повлиять на исход микоза: образование конидий на поверхности насекомых или септицемия и бактериальное разложение трупов. Однако, реакции иммунитета при «классических микозах» и микозах, осложненных пролиферацией бактериальных ассоциантов не изучались.

#### **1.4. Заключение по литературному обзору**

Проведенный анализ литературы демонстрирует, что развитие микозов у насекомых представляет собой сложный динамический процесс, исход которого определяется тройственным взаимодействием между энтомопатогенным грибом, иммунной системой хозяина, а также его ассоциированной микробиотой. Динамика взаимодействий между этими компонентами может быть опосредована факторами окружающей среды.

Симбиотические бактерии могут выступать как ключевой компонент защиты хозяина, напрямую подавляя патогены (через выделение антибиотиков, конкуренцию) или опосредованно усиливая его иммунитет. Однако в других случаях они способны осложнять течение грибной инфекции, вызывая сочетанные патогенезы, что часто приводит к ускоренной гибели насекомого. Этот переход от защитной к патогенной роли может инициироваться самим грибом через подавление иммунитета хозяина.

Абиотические и биотические стрессоры критически влияют на патогенез, изменяя физиологическое состояние хозяина, вирулентность патогена и состав

микробиома. Температурный стресс может как усиливать иммунный ответ (например, через индукцию HSP), так и подавлять его, повышая восприимчивость к патогенам. Токсины часто действуют синергично с энтомопатогенными грибами, подавляя защитные системы насекомого.

Иммунный ответ насекомого — многоуровневая система защиты. Устойчивость обеспечивается барьерными структурами (кутикула, перитрофическая мембрана), клеточными (фагоцитоз, инкапсуляция) и гуморальными реакциями. Ключевую роль играют консервативные сигнальные пути (Toll, Imd, MAPK, JAK/STAT), приводящие к выработке широкого спектра антимикробных пептидов и активации эффекторных систем, таких как меланогенез и продукция активных кислородных метаболитов.

Несмотря на прогресс в изучении иммунного ответа насекомых к разным патогенам, многие аспекты остаются малоизученными. В частности, слабо раскрыты механизмы, по которым факторы среды изменяют баланс в системе «гриб-насекомое-бактериальные ассоцианты», определяя переход бактерий от симбионтов к патогенам. Требуют детализации специфические особенности иммунно-сигнальных путей у *L. decemlineata* и *G. mellonella*. Изучение этих сложных сетевых взаимодействий необходимо для разработки эффективных и прогнозируемых стратегий микробиологического контроля насекомых-вредителей. Поскольку на сегодняшний день исследований на эту тему недостаточно, необходимо рассмотреть факторы, способные оказывать влияние на сценарии развития микозов и сочетанных инфекций у насекомых. Это может быть весьма актуальным для разработки современных методов биологического контроля.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Насекомые и грибы

В работе использованы природные популяции колорадского жука, собранные на картофельных полях (Новосибирская область, 53° 44' с. ш., 78° 02' в. д.) без обработки инсектицидами, лабораторные популяции вощинной огневки *G. mellonella* и паразитоидов *H. hebetor*, культуры энтомопатогенных грибов *B. bassiana* (штамм Sar-31, регистрационный номер GenBank MZ564259), *M. robertsii* (штамм P-72, регистрационный номер GenBank KP172147), *C. militaris* (штамм CNAp, регистрационный номер GenBank MF073255.1) из коллекций ИСиЭЖ СО РАН.

Культуры грибов культивировали на декстрозном агаре Сабуро с дрожжевым экстрактом (2.5 г/л) (SDAY) при 23-25°C в течение 10-22 дней (в зависимости от культуры) до обильного спороношения. Для перкутанного заражения насекомых конидии суспендировали в водном растворе Твин-20 (0.03%). Для инъекций конидии суспендировали в физиологическом растворе (0.9% NaCl) без каких-либо детергентов и фильтровали через стерильную ткань для удаления скоплений мицелия. Концентрации конидий определяли с помощью стандартных гемоцитометров. Жизнеспособность конидий проверяли путем посева на агар Сабуро и расчета процента прорастания. Для приготовления суспензии использовали конидии, прорастание которых превышало 95%.

Лабораторные популяции *G. mellonella* выращивали при температуре 28 °С, относительной влажности 60 % в темноте и питались искусственной средой, содержащей 22.5 % кукурузной муки, 12.5 % мёда, 12.5 % глицерина, 12.5% пчелиного воска, 10% пшеничной муки, 12.5% сухого молока, 5% дрожжей и 12.5% воды. Паразитоиды содержались при температуре 28 °С и 14-часовом световом периоде, имаго питались 12 % раствором мёда, личинки – гусеницами вощинной огневки.

Природно-лабораторные популяции колорадского жука содержались в 20-литровых вентилируемых пластиковых контейнерах при 23 °С и 16-часовом световом периоде. Кормление осуществлялось побегами картофеля.

## **2.2. Дизайн экспериментов и процедуры биотестирования**

### **2.2.1. Влияние концентрации конидий на развитие инфекций и экспрессию генов**

Для изучения влияния концентрации конидий на развитие инфекции были использованы личинки IV возраста колорадского жука (4–5 часов после линьки). Личинок заражали путём погружения на 15 секунд в суспензию конидий гриба с концентрацией  $1 \times 10^7$  и  $1 \times 10^6$  конидий/мл для получения острого и пролонгированного микозов соответственно. Контрольные личинки были обработаны водным раствором Твин-20 (0.03%). Личинки содержались в вентилируемых пластиковых контейнерах объёмом 350 мл (по 10 личинок в каждом) с листьями картофеля (6 г на контейнер в сутки) при температуре 25–26 °С, относительной влажности 25–30 % и световом дне 16:8. Смертность насекомых регистрировалась ежедневно в течение 10 суток. Для учётов смертности использовалось шесть повторностей (1 повторность = 10 личинок) каждого варианта эксперимента. Для определения причин смерти трупы помещали на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри. Временные точки для измерения физиологических параметров, КОЕ бактерий и экспрессии генов были выбраны до начала гибели насекомых, когда смертность не превышала 20%, чтобы не учитывать в анализе насекомых, отобранных по устойчивости к грибу. В случае острого микоза использовалась временная точка через 48 часов после заражения. В случае хронического микоза использовались две временные точки: 48 и 96 часов. Контрольных личинок также анализировали в две временные точки: 48 и 96 часов. Для анализов были взяты кутикула, жировое тело и кишечник насекомых. Для анализа сообществ бактерий были взяты трупы после 2-суточной инкубации во влажных камерах.

### **2.2.2. Влияние яда *H. hebetor* на развитие инфекций и экспрессию генов**

Для исследования влияния яда *H. hebetor*, на развитие микоза и экспрессию генов у вошинной огневки двухдневных самок паразитоида подсаживали к личинкам *G. mellonella* V возраста в чашки Петри диаметром 90 мм и оставляли на 12 ч (12 личинок огневки и 3 самки бракона на каждую чашку). Затем яйца паразитоида удаляли с кутикулы огневки ватным тампоном. Не парализованных и парализованных гусениц заражали *M. robertsii* путем погружения в суспензию с концентрацией конидий  $2 \cdot 10^7$  конидий/мл на 15 сек. В контрольных вариантах не парализованных и парализованных гусениц обрабатывали водным раствором Твин-20 (0.03%). Насекомых содержали при 28 °С и 90-95% RH в темноте. Смертность регистрировали в течение 10 суток. Для биотестирования использовали по 30 личинок в каждом варианте. Для оценки экспрессии генов в кутикуле и жировом теле взята временная точка 48 ч после инфицирования грибом.

### **2.2.3. Влияние токсина фитопатогенных грибов – тенуазоновой кислоты на иммуно-физиологические параметры и развитие инфекций**

Тенуазоновая кислота была предоставлена лабораторией Фитотоксикологии и биотехнологии (Всероссийский институт защиты растений, г. Пушкин). Для исследования влияния данного соединения на экспрессию генов и развитие инфекций использованы личинки II возраста вошинной огневки. Кислоту разводили в ацетоне и добавляли в среду для огневки (250 мкл на грамм среды) до достижения конечных концентраций 0.0 (контроль), 0.2, 1.0 и 5.0 мг кислоты на грамм среды. Среду гомогенизировали, а затем оставляли открытой в течение 1 ч при 26 °С для испарения ацетона. Кусочки питательной среды (1 г) помещали в стеклянные чашки Петри диаметром 90 мм. В каждую чашку помещали по пятнадцать личинок и инкубировали при 27 °С и относительной влажности 75% в темноте. Личинки ежедневно употребляли среду с добавлением тенуазоновой кислоты, в течение 10 дней. Смертность регистрировалась каждые сутки. Вес

личинок регистрировали на 0, 2, 4, 6, 8, и 10-й дни. В биотестах использовали три повторности (1 повторность = 15 личинок) на каждую экспериментальную группу. Для оценки экспрессии генов и оценки КОЕ бактерий кишечника взята временная точка 48 ч после начала питания кормом. В качестве исследуемых тканей были взяты кишечник и жировое тело.

Для оценки восприимчивости личинок *G. mellonella* к энтомопатогену *B. bassiana* использовали промежуточную концентрацию ТК 1 мг/г среды. Личинок заражали путём погружения на 15 секунд в суспензию конидий гриба с концентрацией  $2 \times 10^8$  конидий/мл. Контрольные личинки были обработаны водным раствором Твин-20 (0.03%). Смертность регистрировали в течение 8 дней. Для определения уровня прорастания грибом трупы помещали на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри. Использовали 4 повторности (1 повторность = 10 личинок).

#### **2.2.4. Влияние температур на развитие инфекций и экспрессию генов иммунитета**

В экспериментах были использованы личинки последнего возраста воцинной огневки. Личинок инъецировали 4 мкл суспензии, содержащей 2500 конидий *S. militaris*, с помощью микроинъектора с инсулиновым шприцем. Контрольным личинкам вводили физиологический раствор. Инфицированных и контрольных личинок содержали при двух постоянных температурах (25 °С и 15 °С) в 90 мм чашках Петри (по 12 личинок на чашку) с питательной средой (3 г на одну чашку Петри) в темноте. Регистрация смертности проводилась ежедневно в течение 10 дней. Для определения причин смерти трупы помещали на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри и выдерживали при температуре, указанной выше. Для определения смертности использовали три повторности (1 повторность = 12 личинок) для каждого варианта эксперимента и весь эксперимент повторяли дважды. Для определения КОЕ бактерий (кишечник и

гемолимфа) и экспрессии генов (ткани кишечника и жирового тела) брали временную точку 96 ч.

### **2.3. Подсчёт колониеобразующих единиц бактерий и анализ бактериальных сообществ**

Для анализа КОЕ бактерий личинок воцинной огневки подвергали поверхностной стерилизации. Личинок *G. mellonella* подвергали поверхностной стерилизации 3%-ным раствором  $H_2O_2$  и 70%-ным раствором этанола. 45 мкл гемолимфы трех личинок помещали в 100 мкл 150 mM холодного NaCl и немедленно гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора (Sonopuls, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Берлин, Германия). Ткани кишечника трех личинок были объединены в один образец в NaCl и гомогенизированы по той же методике. Образцы разбавляли NaCl в 10, 100 и 1000 раз и аликвоту объемом 100 мкл высевали на среды (желчно-эскулиновый агар для энтерококков и эндоагар для энтеробактерий (HiMedia, Мумбаи, Индия)) в 90 мм чашки Петри. Культуры инкубировали в течение 2 дней при 35°C, а затем подсчитывали количество КОЕ. Количество КОЕ рассчитывали для 10 мкл гемолимфы или один кишечник. Для анализа использовали не менее 5 повторностей.

Для анализа КОЕ кутикулы личинок колорадского жука, их анестезировали потоком  $CO_2$  в течение 6 минут. Затем 5 личинок помещали в стерильные флаконы (15 мл) с 3 мл охлаждённого водного раствора Tween-20 (0,03%). Флаконы встряхивали в горизонтальном положении со скоростью 150 оборотов в минуту в течение 10 минут при температуре +4°C. Затем личинок извлекали стерильными петлями, а суспензии использовали для посева. Для анализа количества КОЕ в гемолимфе поверхность личинок стерилизовали водным раствором перекиси водорода (6%) в течение 30 секунд. Кутикулу прокалывали и 30 мкл гемолимфы от 3 личинок помещали в 200 мкл охлажденного раствора NaCl (150 mM), взбалтывали и использовали для посева. Пробоподготовку

кишечника проводили по той же методике, что и для вошинной огневки (см. выше). Суспензии разбавляли до  $10^1$ – $10^5$ , и 100 мкл аликвоты высевали в чашки Петри диаметром 90 мм на среду с желчно-эскулиновым агаром для подсчета КОЕ бацилл, эндоагар и дифференциальную среду для *Serratia* (HiMedia, Мумбаи, Индия) для подсчета КОЕ энтеробактерий. Чашки Петри инкубировали при температуре 28 °С в течение 48 часов. Затем подсчитывали количество колоний бактерий и пересчитывали количество КОЕ на одну личинку колорадского жука.

Для определения структуры бактериальных сообществ трупов насекомых проводили выделение ДНК из целых трупов с последующим метабаркодингом, проведенным ЦКП Геномика (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск). ДНК была выделена с использованием набора DNeasy PowerSoil (Qiagen, Хильден, Германия). ПЦР-амплификация проведена согласно Наумовой и соавт. (Naumova et al., 2022). В общей сложности 200 нг продукта ПЦР из каждого образца (смесь из трех технических повторений) объединяли и чистили с использованием набора для экстракции гелем MinElute (Qiagen, Хильден, Германия). Полученные библиотеки секвенировали реагентами с парными концами 2×300 п.н. на MiSeq (Illumina Inc., Сан-Диего, Калифорния, США) (Kryukov et al., 2020, 2025; Chertkova et al., 2023).

#### **2.4. Оценка накопления гифальных тел грибов в гемолимфе насекомых и продукции конидий на трупах**

Для анализа накопления гифальных тел у колорадского жука стерильной инсулиновой иглой прокалывали покровы и 5 мкл гемолимфы помещали в 100 мкл антикоагулянта (62 mM NaCl, 100 mM глюкозы, 10 mM ЭДТА, 30 mM цитрата натрия, 26 mM лимонной кислоты, pH 4,6), содержащего фенилтиомочевину (0,4%). Затем гифальные тела подсчитывали в гемоцитометре. Для каждого варианта эксперимента и каждой временной точки использовалось по 10 повторностей (одна повторность = одна личинка).

Для визуализации гифальных тел грибов и бактерий в гемолимфе воцинной огневки проведено градиентное центрифугирование гемолимфы в Перколе (Kryukov et al., 2020) с последующей трансмиссионной электронной микроскопией. Последняя выполнена А.А. Миллером (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск)

Для определения продукции конидий на личинках трупы инкубировали в течение 30 дней во влажных камерах. Затем каждый труп помещали в пробирку с 20 мл 0,1% раствора вода-Твин-20 и перемешивали в течение 3 мин, пока мицелий и конидии не были полностью смыты. Конидии подсчитывали с помощью гемоцитометра и рассчитывали концентрации для каждого трупа.

## **2.5. Оценка количества потребляемой пищи**

Количество потребляемой листвы оценивалось в день перед проведением физиологических тестов. Контрольные и заражённые личинки были помещены по отдельности в чашки Петри диаметром 90 см с предварительно взвешенными листьями картофеля ( $790 \pm 20$  мг). Через 24 часа после кормления листья были снова взвешены после предварительного удаления фекалий с помощью сухой ваты. Затем была рассчитана разница в весе листьев. Корректировка на высыхание была применена на основе инкубации листьев в тех же условиях, но без насекомых ( $n=10$ ). Потеря веса из-за испарения составила 15% через 24 часа. Для каждого варианта обработки и промежутка времени использовалось от 10 до 15 повторностей.

## **2.6. Анализ экспрессии генов**

Для оценки экспрессии генов у личинок колорадского жука и воцинной огневки использовали ткани кутикулы, жирового тела и среднего кишечника без содержимого, препарированные в охлажденном фосфатном буфере. Для анализа использовали 5-6 биологических повторностей. В каждый образец (повторность) были объединены ткани от 5-6 личинок.

Все ткани замораживали в жидком азоте и затем хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ткани гомогенизировали в лизирующем реагенте Лира и выделяли РНК в соответствии с инструкциями производителя (Биолабмикс, Новосибирск). Количество и качество общей РНК оценивали с помощью NanoDrop NanoVue Plus. Каждый образец нормализовали до концентрации 1,5 мкг/мкл и обрабатывали ДНКазой, не содержащей РНКаз RQ1. РНК преобразовывали в кДНК с использованием 6 мкг РНК, не содержащей ДНК, 3 мкл случайных наномеров 100 нМ и 4 мкл обратной транскриптазы RevertedAid™ M-MuLV. кПЦР проводили с использованием смеси HS-qPCR SYBR Blue (2×) на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США). Реакцию проводили в трех технических повторностях для каждого образца при следующих условиях:  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 3 мин и затем 40 циклов при  $94^{\circ}\text{C}$  в течение 15 с, отжиг, удлинение и измерение флуоресценции при  $60^{\circ}\text{C}$  в течение 30 с. Качество продукта ПЦР подтверждали после каждой реакции с помощью кривых плавления, определенных при температуре от 70 до  $90^{\circ}\text{C}$ . Экспрессию генов рассчитывали в соответствии с протоколом  $\Delta\Delta\text{C}_q$ , описанным в CFX Manager.

В качестве референсных генов *G. mellonella* были использованы фактор элонгации 1-альфа 1 (*eEF1a*) и 11 субъединица ДНК-направленной РНК-полимеразы II (*RBP11*). В качестве целевых генов *G. mellonella* проанализирована экспрессия генов антимикробных пептидов *галлеримицина*, *галиомицина*, *гловерина*, *цекропина*, а также ингибитора металлопротеиназ (*impr1*), ингибитора апоптоза (*Iap*), гена содержащий домен NADF-N оксидазы (*Nox*) и белков теплового шока (*hsp70* и *hsp 90*) (Приложения, табл. 1) (Kryukov et al., 2020; Kosman et al., 2025). Последовательности праймеров были взяты из работы Ланге с соавт. (Lange et al., 2018), Мело и соавт. (Melo et al., 2013) или сконструированы У.Н. Роцкой (ИСиЭЖ СО РАН) (Kryukov et al., 2020, 2023). Свойства праймеров оценивали с помощью IDT OligoAnalyser 3.1.

Для изучения экспрессии генов личинок колорадского жука в качестве референсных использовались гены рибосомальных белков 4 и 18 (*rp4* и *rp18*) и

факторы рибозилирования белков (*arf2* и *arf19*) (Приложения, табл. 2) (Rotskaya et al., 2021; Antonets et al., 2024). Эти гены и последовательности праймеров были взяты из работы Ши и соавт. (Shi et al., 2013). В качестве целевых изучена экспрессия генов *dorsal*, *nf-kb*, *stat*, *mesh*, *attacin* и *ricin-like  $\beta$ -lectin*, сконструированных У. Н. Рощкой (ИСиЭЖ СО РАН) (Rotskaya et al., 2021; Kryukov et al., 2025).

## 2.7. Статистическая обработка данных

Различия в динамике смертности анализировали с помощью логранк теста с последующей поправкой Холма–Сидака. Синергистический и аддитивный эффекты в смертности определяли по методике Робертсона и Прайслера (Robertson and Preisler, 1992), на основе сравнения наблюдаемой и ожидаемой смертности. Критерий  $\chi^2$  применялся при оценке доли мумифицированных и разложившихся личинок.

Для оценки нормальности распределения данных иммунологических и физиологических параметров был применен W–тест Шапиро-Уилка. Нормально распределенные данные анализировалось с помощью t-критерия Стьюдента (для парных сравнений) или Тьюки-теста (для множественных сравнений). Данные, имеющие ненормальное распределение были проанализированы с помощью критерия Манна-Уитни или Данна, также в зависимости от количества вариантов эксперимента. Для двухфакторного анализа применялся непараметрический аналог Two-Way ANOVA – тест Шейрера–Рэя–Хэйра (Scheirer et al., 1976).

Анализы проводились в программах PAST 3.0 (Hammer et al., 2001), Statistica 8 (StatSoft Inc.), Attestat (Gaidyshev, 2004) и SigmaStat 3.1 (Systat Software Inc.). Данные на графиках представлены в виде средних арифметических и стандартных ошибок.

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Ранее было установлено, что острое развитие микозов у насекомых, в частности, у колорадского жука, сопровождающееся ранней гибелью (3-5 суток), приводит к бактериальному разложению трупов (например, Крюков и др., 2007). Для классического развития микоза, заканчивающегося мумификацией и конидиеобразованием на трупах, требуется более долгий период развития болезни (6-13 и более суток). Однако иммунные реакции у насекомых хозяев при развитии этих типов микозов не изучались. В данном разделе мы моделировали острый и пролонгированный типы микозов у колорадского жука и анализировали показатели численности бактерий и уровень экспрессии генов иммунитета в разных тканях личинок жука: кутикулы, жирового тела и кишечника.

#### 3.1.1. Общая характеристика острого и пролонгированного микозов колорадского жука

При остром микозе ( $1 \times 10^7$  конидий/мл) 80% гибель достигалась уже через 4 суток (рис. 1). При пролонгированном микозе ( $1 \times 10^6$  конидий/мл) личинки погибали значительно медленнее, и итоговая смертность достигала 94% только на 10-е сутки ( $\chi^2 = 73.5$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$  по сравнению с острой инфекцией, рис. 1). В контрольной группе смертность достигала 15% за 10 дней эксперимента и значительно отличалась от смертности при обоих типах микоза ( $\chi^2 > 81.7$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ ). Все личинки, погибшие в результате острой инфекции, разлагались, и на трупах не наблюдалось роста мицелия ( $N = 100$ ). Личинки, погибшие после продолжительной инфекции, мумифицировались и прорастали грибом (94%,  $N = 100$ , рис. 1).

Через 48 ч после обработки обеими концентрациями конидий гифальные тела грибов не были обнаружены в гемолимфе у личинок колорадского жука (рис. 1Б).

При остром течении инфекции у погибающих личинок (через 94-144 ч после обработки) регистрировалось не более  $4 \times 10^6$  гифальных тел на мл гемолимфы. При пролонгированном течении микоза плотность гифальных тел у погибающих личинок (через 144 ч после обработки) была более высокой и составляла  $2 \times 10^7$  на мл гемолимфы. Потребление личинками листьев картофеля при остром микозе через 48 ч после инокуляции уменьшилось в 7 раз ( $p < 0.001$  по сравнению с пролонгированным микозом, рис. 1В). При длительном течении инфекции снижение потребления корма (в 1.8 раза) наблюдалось только через 72-96 ч, но этот эффект был незначительным ( $p = 0.07$  по сравнению с контролем). Таким образом, в отличие от пролонгированного микоза, острая грибная инфекция приводит к слабому накоплению гифальных тел гриба и последующему разложению личинок. Кроме того, во время острой инфекции резко снижается потребление корма.

### **3.1.2. Анализ изменения бактериальных сообществ в различных тканях у личинок колорадского жука при остром и пролонгированном микозе**

Повышение количества КОЕ бактерий регистрировалось как при остром, так и при пролонгированном микозах во всех тканях: кутикуле, гемолимфе и среднем кишечнике, однако, острая инфекция вызывала более сильный всплеск численности бактерий (рис. 2). В контрольной группе на кутикуле была обнаружена низкая плотность бактерий ( $10^3$ – $10^4$  КОЕ на личинку). Через 48 часов после заражения количество КОЕ не изменилось при пролонгированном течении инфекции, но значительно увеличилось при остром: в 6–10 раз на эндоагаре и дифференциальной среде для *Serratia*, и в 240 раз на желчно-эскулиновом агаре ( $p < 0.04$  по сравнению с контрольной группой). Через 96 часов было зарегистрировано небольшое, но значимое увеличение количества КОЕ на эндоагаре и дифференциальных средах *Serratia* при пролонгированном микозе ( $p < 0.02$  по сравнению с контролем).

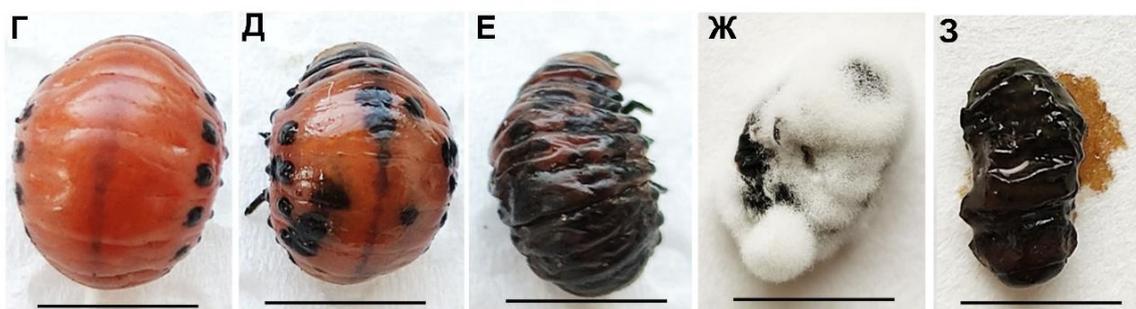
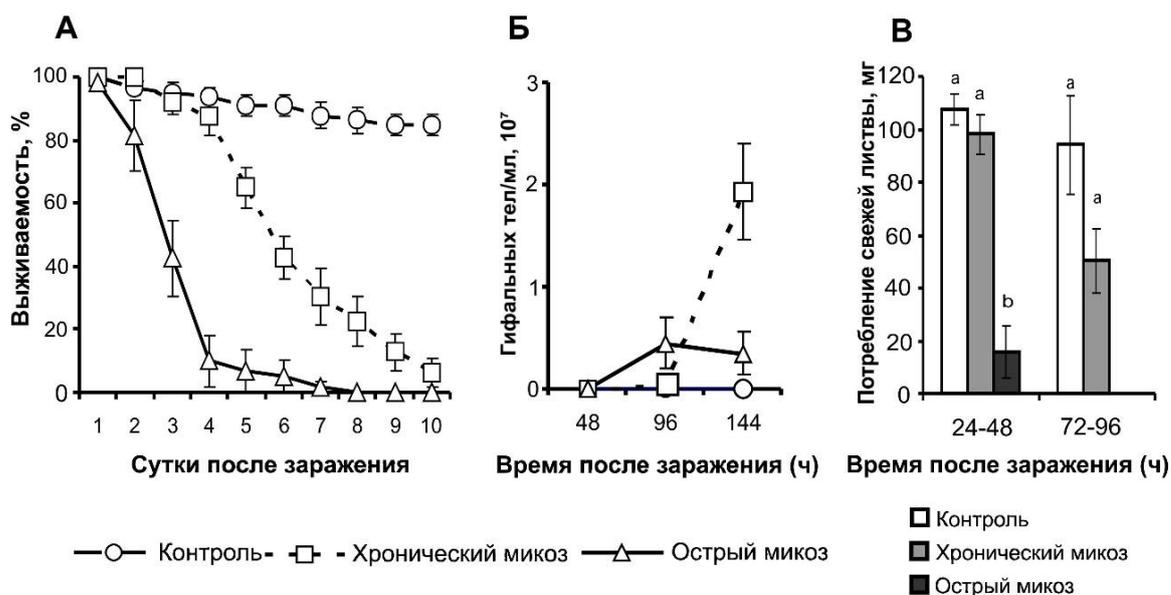


Рисунок 1. Динамика выживаемости (А); накопление гифальных тел в гемолимфе (Б); потребление свежей листвы одной личинкой за 24 ч (В); фенотип личинок в контроле (Г); симптомы микоза у личинок при пролонгированном (хроническом) (Д) и остром (Е) течении инфекции через 48-72 ч после обработки; грибное спороношение при развитии пролонгированной инфекции (Ж) и бактериальное разложение при острой инфекции (З). Масштабная линейка 5 мм. Разные буквы указывают на статистически значимые различия между вариантами в каждой временной точке (тест Данна для 48 часов, тест Манна — Уитни для 96 часов,  $p < 0.05$ ).

В гемолимфе наблюдались аналогичные изменения значений КОЕ (рис. 2). Через 48 часов после обработки в случае пролонгированного течения инфекции существенных различий по сравнению с контролем зарегистрировано не зарегистрировано, однако при острой инфекции на всех средах наблюдалось 7-10-кратное увеличение значений КОЕ ( $p < 0.02$  по сравнению с контролем). В условиях длительного микоза небольшое, но статистически значимое увеличение

количества КОЕ было зарегистрировано только на эндоагаре через 96 часов ( $p = 0.004$  по сравнению с контролем).

В среднем кишечнике при остром течении инфекции через 48 часов было зарегистрировано статистически значимое увеличение количества КОЕ на всех средах ( $p < 0.05$  по сравнению с контролем, рис. 2). При длительной инфекции существенное увеличение количества КОЕ наблюдалось только на желчно-эскулиновом агаре в обеих временных точках ( $p < 0.037$  по сравнению с контролем).

При анализе бактериального сообщества целого тела личинок установлено, что в живых насекомых (контроль) преобладал облигатный симбионт *Spiroplasma*, в то время как в погибших личинках значительно увеличилось количество *Enterobacteriaceae*, *Citrobacter*, *Acinetobacter* и *Pseudomonas* ( $p < 0.01$  по сравнению с контролем, рис. 3). Бактериальное сообщество трупов, разложившихся вследствие острого микоза, отличалось более высоким обилием *Citrobacter* (в 10 раз;  $p = 0.005$ ) и *Pseudomonas* (в 3 раза;  $p = 0.02$ ) по сравнению с сообществом бактерий личинок, погибших в ходе развития пролонгированного микоза, т. е. мумифицировавшихся.

Таким образом, острая инфекция *B. bassiana*, у личинок колорадского жука приводит к более раннему и сильному увеличению численности бактерий на поверхности кутикулы, в гемолимфе и в среднем кишечнике. Высокая концентрация конидий при остром заражении вызывала слабое накопление гифальных тел в гемоцеле, бактериальное разложение трупов насекомых и отсутствие спорообразования на них гриба. В отличие от этого, умеренные концентрации гриба приводили к типичному развитию микоза с обильным образованием конидий на погибших насекомых. Следует отметить, что в исследуемых тканях увеличилась плотность как грамотрицательных энтеробактерий (КОЕ на эндоагаре и среде для *Serratia*), так и грамположительных бацилл (КОЕ на желчно-эскулиновом агаре). Однако в разложившихся трупах доминировали грамотрицательные *Enterobacteriaceae*. Это

позволяет предположить, что в процессе бактериального распада трупов энтеробактерии вытесняют бацилл.

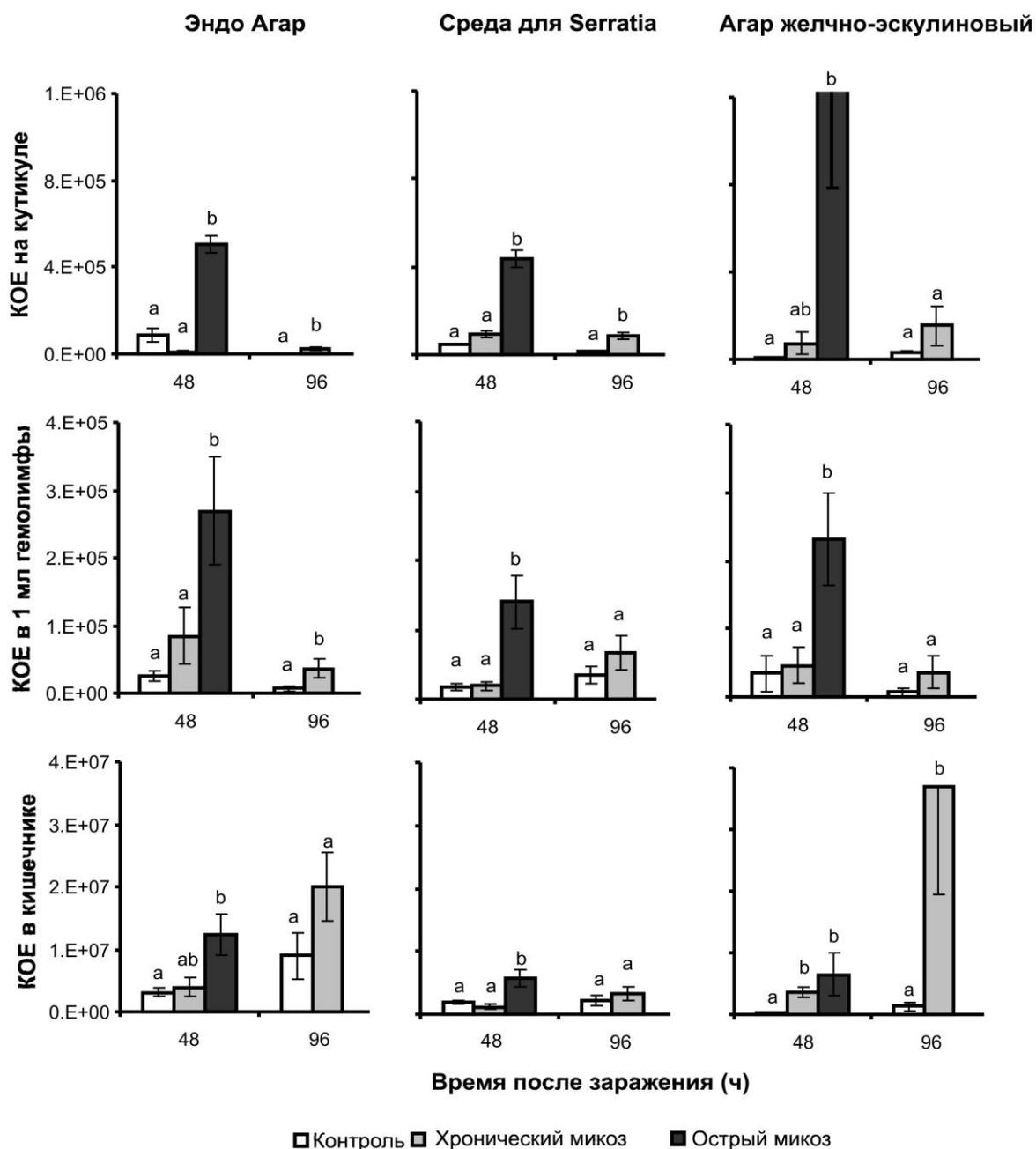


Рисунок 2. Количество КОЕ бактерий на кутикуле, в гемолимфе и в среднем кишечнике личинок колорадского жука при пролонгированном (хроническом) и остром течении инфекции, вызванной *B. bassiana*. Разные буквы указывают на статистически значимые различия между вариантами в каждой временной точке (тест Данна для 48 часов, тест Манна–Уитни для 96 часов,  $p < 0.05$ ).

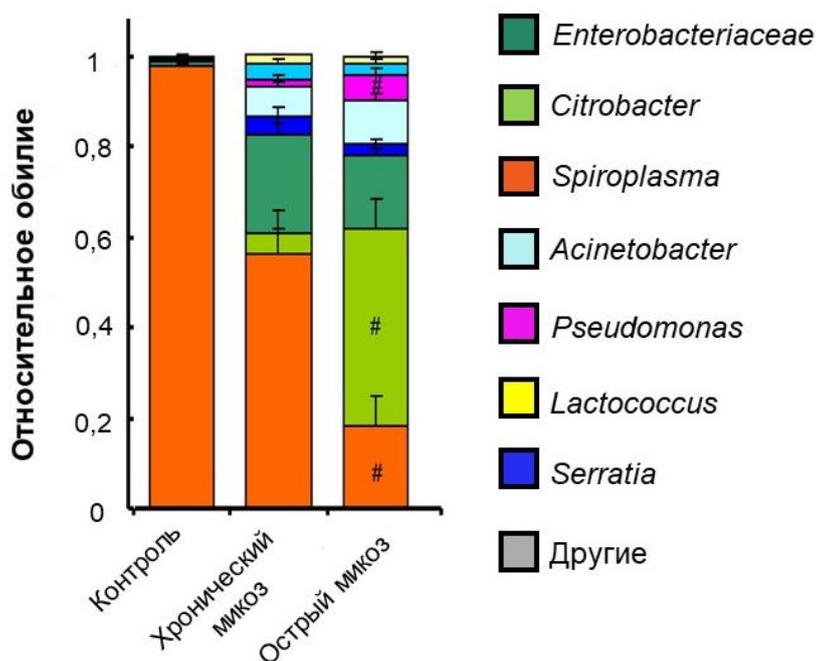


Рисунок 3. Состав бактериальных сообществ трупов личинок колорадского жука на уровне рода при развитии хронического и острого микоза. # статистически значимые различия между хроническим и острым микозом (тест Данна,  $p < 0.05$ ).

Вероятно, увеличение количества бактерий на кутикуле при остром течении инфекции связано с более значительным повреждением покровов и усилением рельефности кутикулы. Известно, что нарушения целостности кутикулы, вызванные грибом, могут способствовать инфлюксу бактерий в гемоцель. Например, Вей и Фарг (Vey, Fargues, 1977) показали, что повреждение покровов личинок колорадского жука грибом *B. bassiana* способствует инвазии бактерий под кутикулу. Согласно описанию авторов, проникающие бактерии, имели палочковидную форму и были грамотрицательными, что указывает на их возможную принадлежность к *Enterobacteriaceae*. Последнее подтверждается нашими экспериментами, показавшими, что в трупах жука, доминируют *Citrobacter*. Эти бактерии являются типичными ассоциантами кишечника колорадского жука (Muratoglu et al., 2011; Kryukov et al., 2019, 2021b), но могут попадать на кутикулу при регургитации. Отметим, что ранее колонизация гемоцели энтеробактериями отмечалась при разных инфекциях у разных таксонов

насекомых (Broderick et al., 2006; Wei et al., 2017; Kryukov et al., 2020), однако ведущая роль *Citrobacter* в посмертной колонизации, по-видимому, является особенностью личинок колорадского жука.

### **3.1.3. Анализ экспрессии генов иммунного ответа в различных тканях личинок колорадского жука при остром и пролонгированном микозе**

Как и анализ КОЕ, анализ экспрессии генов проведен через 48 ч для острой и пролонгированной инфекции, а также через 96 ч только для пролонгированной инфекции, так как при острой инфекции насекомые погибали к этому сроку. Наиболее важным моментом было сопоставить экспрессию генов перед началом массовой гибели личинок, когда наряду с грибами в них активно размножаются бактерии (48 ч для острой и 96 ч для пролонгированной инфекции; рис. 4).

В кутикуле транскрипционные факторы сигнальных путей Toll (*dorsal*) и IMD (*nf-kb*) активировались через 48 часов при развитии острой инфекции (в 2-5 раз,  $p < 0.005$  по сравнению с контролем), но не при пролонгированной ( $p > 0.11$ ). Через 96 часов при пролонгированной инфекции наблюдалась активация транскрипционных факторов Toll и IMD, уровень которой превышал контрольные значения в 3–9 раз ( $p < 0.01$ ). Важно, что наиболее сильное увеличение экспрессии транскрипционного фактора пути IMD (*nf-kb*) перед началом гибели было зарегистрировано именно при пролонгированной инфекции. Транскрипционный фактор сигнального Jak/Stat (*stat*) демонстрировал достоверную активацию по сравнению с контролем ( $p = 0.005$ ) только при длительной инфекции (через 96 ч после заражения).

В жировом теле изменения в экспрессии транскрипционных факторов Toll (*dorsal*) и IMD (*nf-kb*) демонстрировали те же тенденции, что и в кутикуле, и наиболее сильная активация наблюдалась через 96 часов при развитии пролонгированного микоза (в 4–6 раз,  $p < 0.004$  по сравнению с контролем). Сходным образом экспрессия гена *stat* перед началом массовой гибели усиливалась только при пролонгированной инфекции (96 ч после обработки,  $p =$

0.005 по сравнению с контролем). При остром микозе наблюдалось 3-кратное снижение экспрессии этого гена перед гибелью (48 ч,  $p = 0.01$  по сравнению с контролем).

В среднем кишечнике наблюдались более слабые, но также существенные изменения в экспрессии генов (рис. 4). Уровень экспрессии *dorsal* повышался в 1.4–1.8 раза через 48 часов после обработок, но существенные изменения были выявлены только в ответ на острый микоз ( $p = 0.048$  по сравнению с контролем). Через 96 часов развития пролонгированного микоза различия были не существенными. Экспрессия *nf-kb* повышалась в ответ на инфекции, но значительные изменения были зарегистрированы только через 96 часов развития пролонгированного микоза ( $p = 0.049$  по сравнению с контролем). Во время длительного микоза наблюдалось снижение экспрессии в 1.3–2.2 раза гена регулятора двойной оксидазы (*mesh*), но статистически значимые различия были выявлены только через 96 часов после обработки ( $p = 0.024$ ). Транскрипционный фактор *stat* не демонстрировал значительных изменений в экспрессии по сравнению с контролем ( $p > 0.17$ ), однако при длительном микозе наблюдалась тенденция к снижению экспрессии. Следует отметить, что гены *stat* и *mesh* демонстрировали схожие паттерны регуляции в кишечнике, и между экспрессией этих генов наблюдалась тесная корреляция ( $r = 0.92$ ;  $p = 0.029$ ,  $N = 5$ ).

Помимо сигнальных и регуляторных генов, на данной модели нами была проанализирована экспрессия некоторых эффекторных генов в кутикуле и жировом теле: аттацина и рицинового  $\beta$ -лектина. Экспрессия этих генов имела паттерны аналогичные с экспрессией транскрипционных факторов сигнальных путей Toll (*dorsal*) и IMD (*nf-kb*) (Приложения, рис.1).

Как было описано выше (раздел 1.3.2.2.), путь Toll активируется преимущественно грибами и грамположительными бактериями, а путь IMD — грамотрицательными бактериями. При этом между этими системами существует кросс-регуляция (Jang et al., 2022).

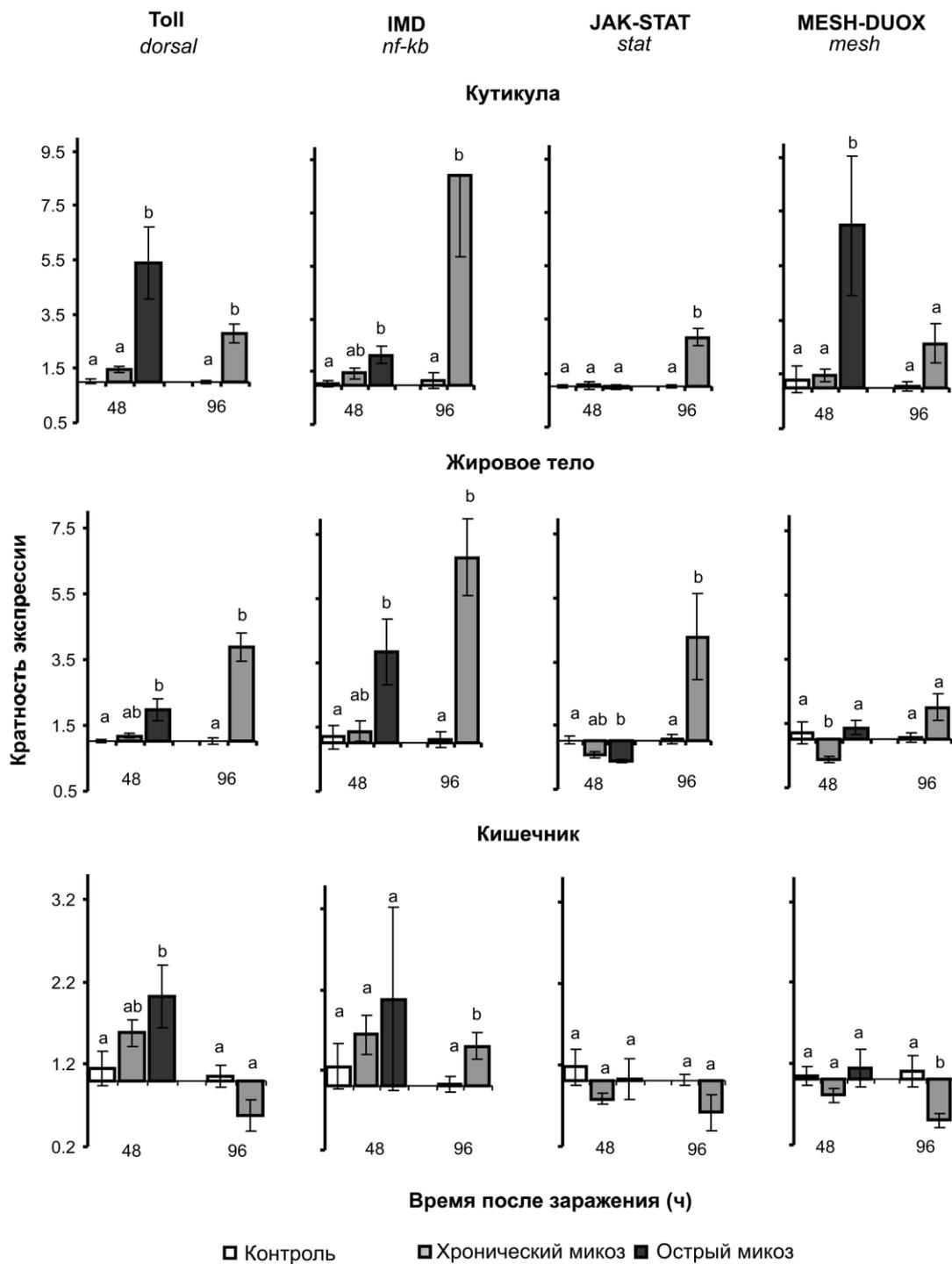


Рисунок 4. Изменения экспрессии транскрипционных факторов иммунно-сигнальных путей Toll, IMD и JAK-STAT, а также гена регулятора двойной оксидазы (*mesh*) в кутикуле, жировом теле и среднем кишечнике личинок колорадского жука при развитии пролонгированной и острой инфекции *B. bassiana*. Показана кратность экспрессии относительно контроля в каждой временной точке. Разные буквы указывают на статистически значимые различия между вариантами в каждой временной точке (тест Данна для 48 ч и тест Манна-Уитни для 96 ч,  $p < 0.05$ ).

В наших экспериментах экспрессия транскрипционного фактора пути IMD была наиболее высока при длительной инфекции перед наступлением гибели личинок. Аналогичные паттерны экспрессии показали гены антимикробных пептидов аттацина и рицинового- $\beta$ -лектина в жировом теле и кутикуле (Приложения, рис. 1). Сходным образом, путь JAK/STAT активировался только в случае пролонгированного микоза. Помимо противовирусной защиты, путь JAK/STAT участвует в ответе на бактериальные и грибные инфекции, а также на паразитоидные инвазии (Dong et al., 2012; Yang & Hultmark, 2016; Prakash et al., 2023). Дифференциальная регуляция компонентов JAK/STAT при микозах наблюдается у различных насекомых (Geng et al., 2016; Ramirez et al., 2018; Li et al., 2023), включая колорадского жука (Kryukov et al., 2022). Некоторые исследователи продемонстрировали, что химическое ингибирование JAK/STAT повышает восприимчивость чешуекрылых к *B. bassiana* (Geng et al., 2016; Li et al., 2023). Что касается бактерий, показано, что сигнальный путь JAK/STAT активируется кишечной инфекцией *Erwinia carotovora* у *D. melanogaster* (Buchon et al., 2009), а также *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* у *Bombix mori* (Wu et al., 2010). Пракаш и соавторы (Prakash et al., 2023) показали, что сигнальный путь JAK-STAT участвует в формировании устойчивости *D. melanogaster* к системной инфекции, вызванной *Pseudomonas entomophila*. Сигнальный путь регулирует пролиферацию и дифференцировку гемоцитов, процессы апоптоза, инкапсуляции, меланизации и углеводного обмена, поэтому участвует в клеточных и гуморальных иммунных реакциях, в том числе в реакции на септические повреждения (Morin-Poulard et al., 2013; Bang, 2019; McMullen et al., 2024)

Мы полагаем, что активация сигнальных путей IMD и JAK/STAT в кутикуле и жировом теле личинок колорадского жука в условиях длительного микоза выполняет защитную функцию, предотвращая преждевременное развитие бактерий и септицемии. Напротив, острая инфекция, характеризующаяся недостаточной индукцией этих путей, может создать условия для быстрого размножения бактерий и разложения хозяина. Таким образом, для успешного

развития, грибу необходим длительный патогенез, позволяющий хозяину сохранить способность к регуляции антибактериальной защиты в определенных тканях и в нужное время. Заражение высокими дозами гриба истощает ресурсы насекомого, делая невозможным эффективный антибактериальный ответ и, как следствие, дальнейшее развитие грибного патогена. Сходным образом, подавление клеточного и гуморального иммунитета колорадского жука различными растительными или микробными токсинами во время микозов может приводить к ранней смерти и отсутствию спорообразования на трупах (Kryukov et al., 2018b, 2021b).

Наши результаты согласуются с недавно полученными данными других авторов. Например, в системе *H. armigera* – *Metarhizium rileyi* было показано, что грибная инфекция опосредованно, через повышение титра экдизона и активацию пути Toll, стимулирует синтез АМП, усиливая антибактериальную защиту в гемолимфе (Wang et al., 2023a). Это наблюдение поддерживает идею о том, что энтомопатогенные грибы могут использовать иммунную систему хозяина как инструмент для подавления бактерий-конкурентов, что согласуется с нашей концепцией о критической роли антибактериального ответа в успешном грибном патогенезе.

В описанной нами модели в среднем кишечнике жука наблюдалось относительно стабильное состояние, о чём свидетельствовало отсутствие активации систем Mesh-Duox и JAK/STAT. Последнее указывает на отсутствие повреждений в эпителии кишечника, которые могли бы способствовать проникновению бактерий в гемоцель. Однако, наряду с этим наблюдалась увеличение количества КОЕ и активация сигнальных путей Toll и IMD. Увеличение бактериальной нагрузки в кишечнике насекомых во время грибной инфекции, вероятно, является общей тенденцией, поскольку оно было зарегистрировано в различных системах хозяин-патоген, таких как имаго комаров *A. stephensi* – гриб *B. bassiana* (Wei et al., 2017), имаго *A. aegypti* – виды *Beauveria* (Ramirez et al., 2018), цикадках *Nilaparvata lugens* – гриб *M. anisopliae* (Wang et al.,

2022), личинки совки *H. armigera* – гриб *M. rileyi* (Wang et al., 2023b). Причины селективного роста определённых бактериальных групп требуют дальнейшего изучения; потенциальными факторами могут быть изменения перистальтики и аэрации кишечника (Polenogova et al., 2019), pH кишечной среды или действие вторичных грибных метаболитов на систему Mesh-Duox (Wei et al., 2017).

Обобщая полученные данные, можно заключить, что основным путём колонизации гемоцели колорадского жука бактериями при острой грибной инфекции является повреждённая кутикула. В то же время в среднем кишечнике личинок колорадского жука наблюдается стабильность условий даже при остром течении микоза. Мы полагаем, что целостность кишечного эпителия, препятствующая массивному проникновению кишечных бактерий в гемолимфу, является необходимым условием для развития «классического» микоза с последующим спороношением. Индукция путей IMD и JAK/Stat при развитии микоза может способствовать успешному завершению жизненного цикла гриба.

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

Ранее было установлено, что у личинок вошинной огневки, парализованных ядом паразитоида *H. hebetor*, повышался уровень пролиферации энтерококков на кутикуле (Kryukov et al., 2022) и энтеробактерий в кишечнике (Polenogova et al., 2019). Однако случаи септицемии у парализованных личинок были относительно редкими. Кроме того, парализованные личинки огневки были устойчивы к оппортунистическим грибам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Scopulariopsis* и др. (Kryukov et al., 2017), но восприимчивость к энтомопатогенным грибам *Beauveria* и *Metarhizium* повышалась катастрофически: в тысячи и сотни тысяч раз (Kryukov et al., 2013, 2022). Поэтому представлялось целесообразным рассмотреть, как изменяется экспрессия генов иммунитета личинок огневки после парализации ядом паразитоида и при развитии грибной инфекции.

### 3.2.1. Изменение восприимчивости личинок *Galleria mellonella* к грибу после парализации паразитоидом

Нами повторены эксперименты, проведенные ранее (Kryukov et al., 2013, 2022) и показано, что восприимчивость личинок вошинной огневки к энтомопатогенным грибам *M. robertsii* значительно возрастает после парализации ядом *N. hebetor* (рис. 5). Так через 10 суток после заражения, смертность парализованных и обработанных грибом личинок составляла 100%, тогда как для непарализованных и зараженных грибом – 10% ( $\chi^2 = 49.1$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ ). Все погибшие личинки мумифицировались и формировали мицелий с конидиями на поверхности кутикулы. Смертности не наблюдалось в вариантах эксперимента без обработки грибом (парализованные и не парализованные личинки).

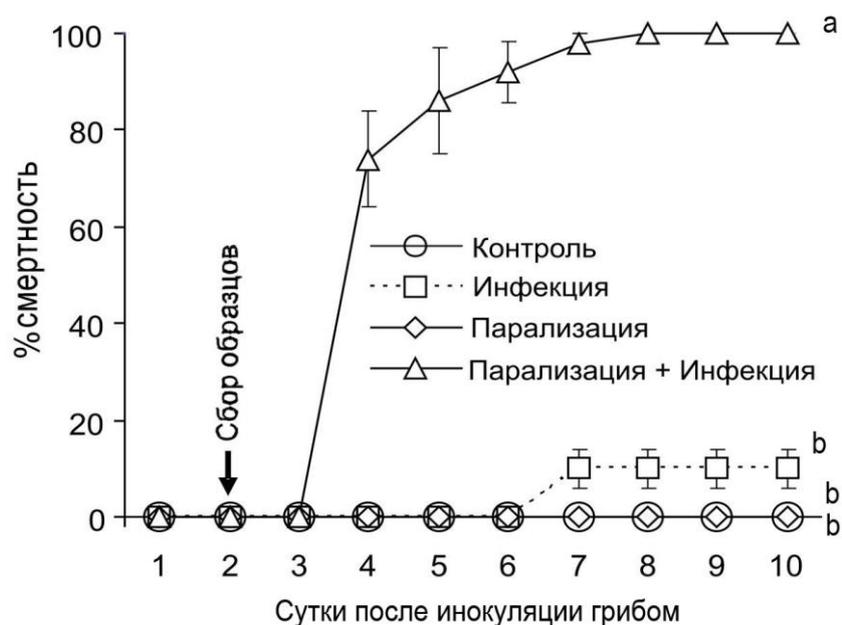


Рисунок 5. Динамика смертности личинок вошинной огневки после парализации ядом *N. hebetor* и заражения *M. robertsii*. Стрелка указывает время взятия образцов для кПЦР (48 ч). Разные буквы указывают на статистически значимые различия в динамике выживаемости ( $\chi^2 = 49.1$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ ).

### 3.2.2. Анализ экспрессии генов иммунного ответа у вошинной огневки при парализации и микозе

Как парализация, так и инфекция *M. robertsii* приводили к подъему экспрессии генов АМП, таких как галиомицин, галлеримицин, цекропин, гловерин. Апрегуляция генов регистрировалась в обеих тканях: жировом теле и кутикуле (рис. 6, табл. 1).

В жировом теле влияние парализации на экспрессию было существенным (двухфакторный анализ:  $H_{1,23} > 6.8$ ,  $p < 0.01$ ), а ответ на грибную инфекцию был в основном на уровне трендов ( $H_{1,23} > 2.8$ ,  $p = 0.7-0.9$ ), за исключением галлеримицина, показавшего четкий подъем под воздействием гриба ( $H_{1,23} = 9.7$ ,  $p = 0.002$ ).

В кутикуле эффекты подъема экспрессии генов АМП были существенными как в ответ на парализацию, так и в ответ на инфекцию: парализация приводила к существенному подъему экспрессии генов галлеримицина, гловерина и цекропина ( $H_{1,23} > 5.1$ ,  $p < 0.02$ ), а эффект грибной инфекции был существенен для всех АМП ( $H_{1,23} > 3.9$ ,  $p < 0.05$ ). Важно отметить, что наибольший подъем экспрессии АМП наблюдался при совместном действии яда и грибной инфекции (рис. 6). Тест Данна показал, что в большинстве случаев наблюдается более сильное (10–100-кратное) увеличение экспрессии генов АМП при совместном воздействии яда и гриба, чем при их раздельном влиянии. Таким образом, личинки, парализованные ядом *H. hebetor*, характеризуются подъемом экспрессии генов АМП в кутикуле и жировом теле и, кроме того, активно реагируют на грибную инфекцию подъемом экспрессии этих генов.

Похожие паттерны экспрессии зарегистрированы для генов, регулирующих АКМ (*nox*) и для ингибитора апоптоза (*iap*) (рис. 7, табл. 2). Эффект парализации на экспрессию *nox* и *iap* был существенным, но только в кутикуле ( $H_{1,23} > 5.9$ ,  $p < 0.02$ , табл. 2). Грибная инфекция не приводила к существенным изменениям активности этих генов. Однако, комбинированное действие инфекции и яда

вызывало более сильный подъем в экспрессии *nox* и *iap* по сравнению с их отдельным действием в жировом теле или кутикуле (рис. 7). В частности, для *nox* в обеих тканях регистрировалось существенное взаимодействие факторов инфекции и парализации ( $H_{1,23} > 6.5$ ,  $p < 0.01$ , табл. 2). Таким образом, парализованные личинки активно реагировали на грибную инфекцию подъемом экспрессии *nox* и *iap*.

Таблица 1. Двухфакторные эффекты инфекции *M. robertsii* и парализации ядом *H. hebetor* на экспрессию генов АМП воцинной огневки. Существенные эффекты выделены жирным шрифтом. Стрелки показывают эффект повышения экспрессии генов на существенном ( $p < 0.05$ ) или пограничном ( $p = 0.05-0.10$ ) уровнях.

Гены	Эффекты		
	Инфекция	Парализация	Взаимодействие факторов
Жировое тело			
Галиомицин	$\uparrow H_{1,23} = 2.8, P = 0.09$	$\uparrow H_{1,23} = 13.2, P < 0.001$	$H_{1,23} = 0.9, P = 0.36$
Галлеримицин	$\uparrow H_{1,23} = 9.7, P = 0.002$	$\uparrow H_{1,23} = 6.8, P = 0.01$	$H_{1,23} = 0.3, P = 0.60$
Гловерин	$\uparrow H_{1,23} = 3.2, P = 0.07$	$\uparrow H_{1,23} = 15.0, P < 0.001$	$H_{1,23} = 0.3, P = 0.56$
Цекропин	$\uparrow H_{1,23} = 3.0, P = 0.08$	$\uparrow H_{1,23} = 9.0, P = 0.003$	$H_{1,23} = 2.3, P = 0.13$
Кутикула			
Галиомицин	$\uparrow H_{1,19} = 4.2, P = 0.04$	$H_{1,19} = 2.1, P = 0.15$	$H_{1,19} = 2.1, P = 0.15$
Галлеримицин	$\uparrow H_{1,19} = 4.5, P = 0.03$	$\uparrow H_{1,19} = 5.9, P = 0.02$	$H_{1,19} = 0.5, P = 0.50$
Гловерин	$\uparrow H_{1,23} = 6.5, P = 0.01$	$\uparrow H_{1,23} = 12.0, P = 0.001$	$H_{1,23} = 0.1, P = 0.82$
Цекропин	$\uparrow H_{1,23} = 3.9, P = 0.05$	$\uparrow H_{1,23} = 5.1, P = 0.02$	$H_{1,23} = 4.1, P = 0.04$

Гены ингибитора металлопротеиназ (*impi*) и теплового шока (*hsp70*) существенно повышали экспрессию в обеих тканях только в ответ на парализацию ядом ( $H_{1,23} > 12.0$ ,  $p < 0.001$ , табл. 2), но не в ответ на грибную инфекцию (рис. 7). Также отмечены несущественные повышения экспрессии при комбинированном действии гриба и яда по сравнению с моно-обработками.

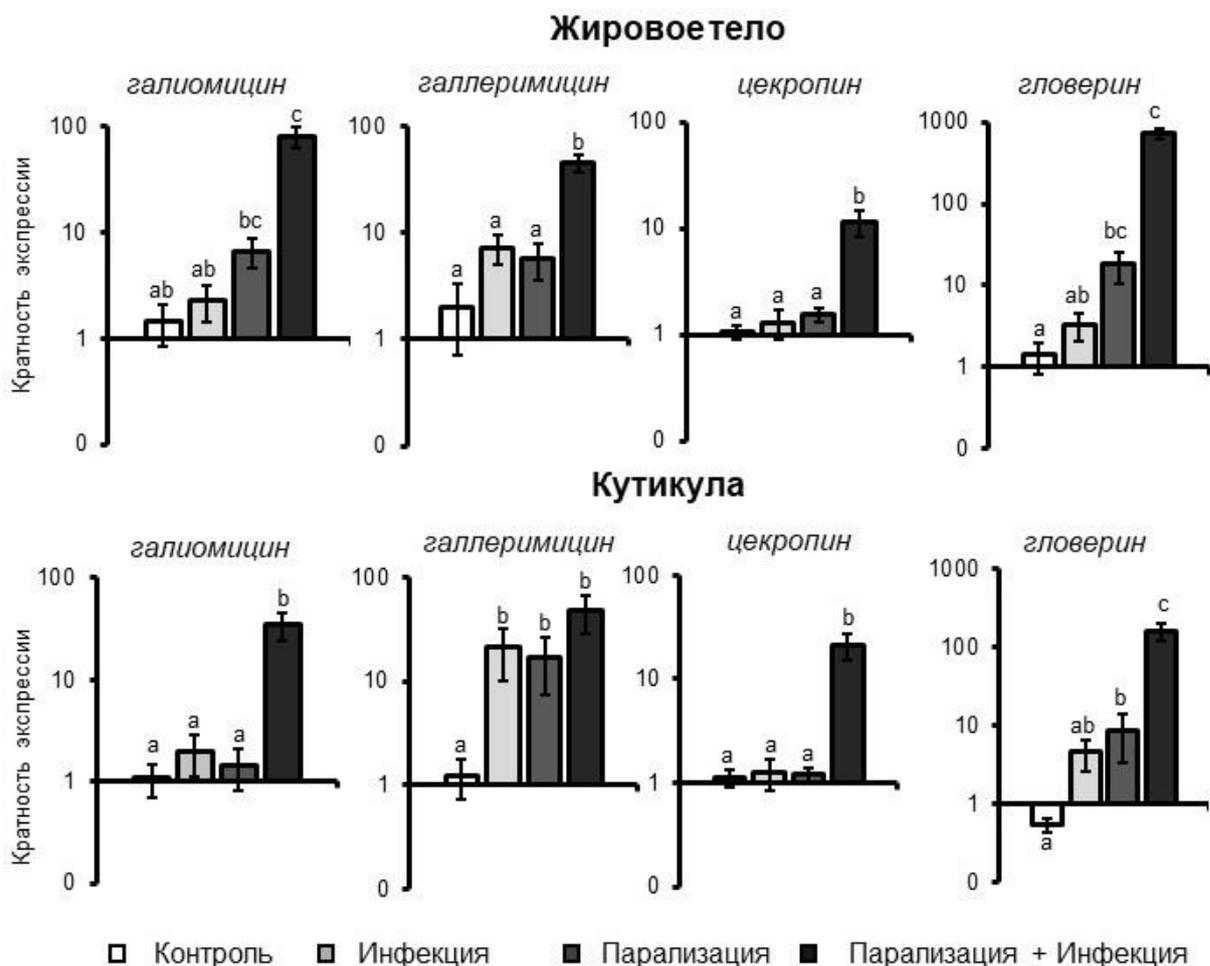


Рисунок 6. Экспрессия генов антимикробных пептидов в тканях жирового тела и кутикулы личинок воцинной огневки под влиянием парализации ядом *H. hebetor* и заражения *M. robertsii* относительно контроля (без парализации и инфекции). Разные буквы указывают на статистически значимые различия между вариантами (тест Данна,  $p < 0.05$ ).

В данном исследовании мы показываем, что парализованные ядом личинки активно реагируют на грибную инфекцию усилением экспрессии генов АМП, а также *nox* и *iap*. Кроме того, в ответ на парализацию происходит подъем экспрессии генов металлопротеиназ и белков теплового шока. Совместное действие инфекции и парализации вызывает наибольший подъем исследуемых показателей иммунитета. Причинами подъема АМП при парализации и грибной инфекции могут быть как непосредственное действие компонентов яда и/или

компонентов клеточной стенки и метаболитов *M. robertsii*, так и сопутствующие бактериальные инфекции.

Таблица 2. Двухфакторные эффекты инфекции *M. robertsii* и парализации ядом *H. hebetor* на экспрессию генов иммунитета воцинной огневки. Существенные эффекты выделены жирным шрифтом. Стрелки показывают эффект повышения экспрессии генов на существенном ( $p < 0.05$ ) или пограничном ( $p = 0.05-0.10$ ) уровнях.

Гены	Эффекты		
	Инфекция	Парализация	Взаимодействие факторов
Жировое тело			
NOX	H1,23 = 1.8, P = 0.18	H1,23 = 1.3, P = 0.25	<b>H1,23 = 8.0, P = 0.005</b>
IAP	↑H1,19 = 3.0, P = 0.08	↑H1,19 = 3.3, P = 0.07	H1,19 = 1.5, P = 0.23
IMPI	H1,23 = 0.0, P = 1	↑ <b>H1,23 = 15.4, P &lt; 0.001</b>	H1,23 = 0.9, P = 0.36
Hsp70	H1,23 = 2.3, P = 0.13	↑ <b>H1,23 = 17.3, P &lt; 0.001</b>	H1,23 = 0.1, P = 0.73
Кутикула			
NOX	H1,23 = 1.6, P = 0.20	↑ <b>H1,23 = 5.9, P = 0.02</b>	<b>H1,23 = 6.5, P = 0.01</b>
IAP	H1,23 = 0.01, P = 0.91	↑ <b>H1,23 = 12.8, P &lt; 0.001</b>	H1,23 = 3.0, P = 0.08
IMPI	H1,23 = 0.8, P = 0.39	↑ <b>H1,23 = 12.0, P = 0.001</b>	H1,23 = 0.1, P = 0.77
Hsp70	H1,23 = 0, P = 1	↑ <b>H1,23 = 17.3, P &lt; 0.001</b>	H1,23 = 0.7, P = 0.42

Известно, что компоненты яда эктопаразитов направлены на обеспечение их личинок питательными веществами, активируя выброс питательных веществ в лимфу из тканей хозяина, в первую очередь, жирового тела (Vecchimanzi et al., 2017; 2020, Kryukova et al., 2021). При этом компоненты яда подавляют клеточные и гуморальные защитные реакции, такие как инкапсуляция, активность фенолоксидазного каскада и коагуляция (Asgari, Rivers, 2011, Werren et al., 2016; Shelby et al., 2000). Поскольку парализованный хозяин с ослабленным иммунитетом становится уязвимым для микроорганизмов, можно ожидать компенсаторной активации альтернативных защитных механизмов, в частности, синтеза антимикробных пептидов (АМП). Наши выводы согласуются с работой

Янг и соавт. (Yang et al., 2019), изучавших влияние яда эктопаразитоида *Pachycrepoideus vindemniae* Rondani на иммунитет куколок *D. melanogaster*. Авторы показали, что яд, подавляя клеточный ответ (включая адгезию гемоцитов и меланизацию), одновременно усиливает активность гуморальных путей Toll, Imd и JAK/STAT, ответственных за продукцию антимикробных пептидов.

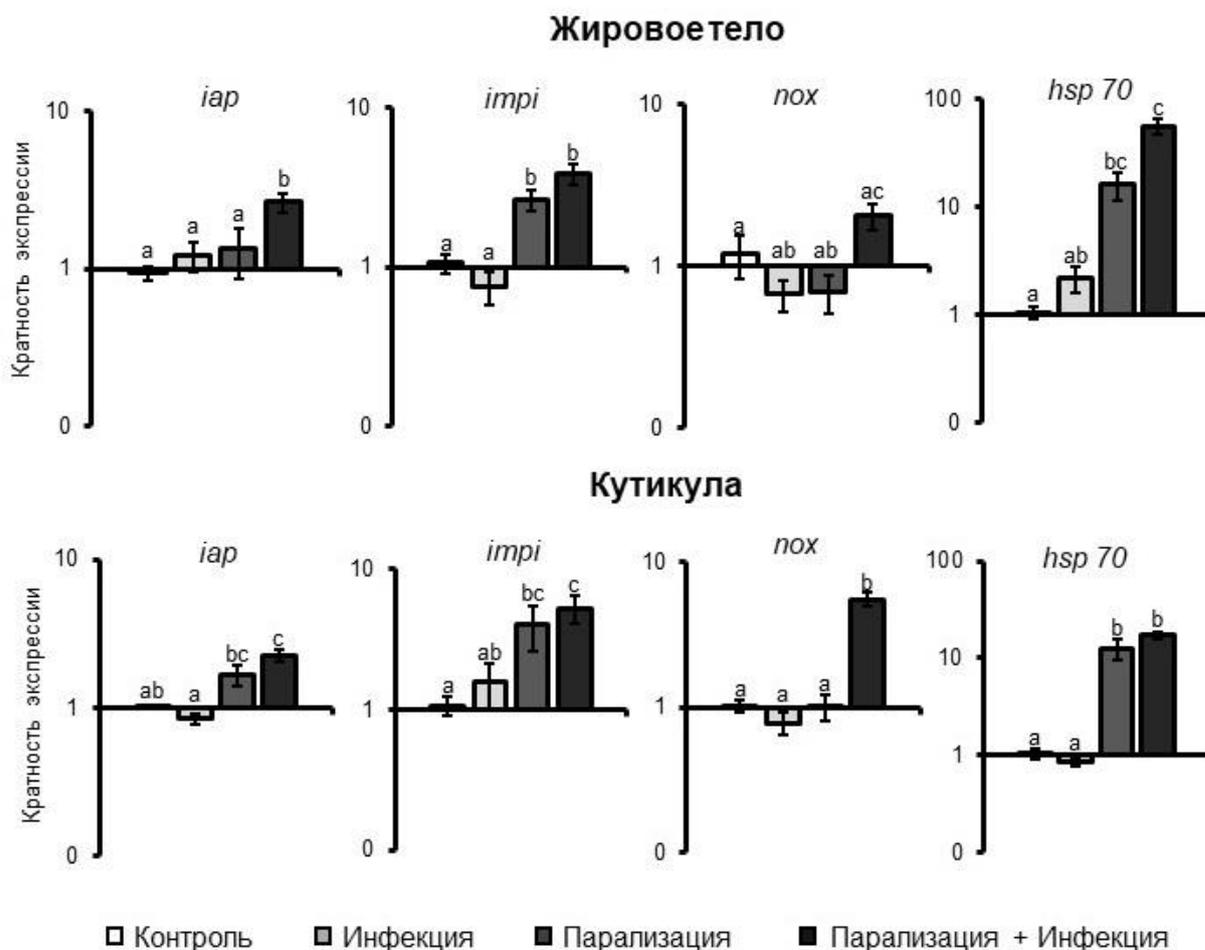


Рисунок 7. Экспрессия генов НАДФН-оксидазы-4 (*nox*), ингибитора апоптоза (*iap*), ингибитора металлопротеиназ (*impi*) и генов теплового шока (*hsp 70*) в тканях жирового тела и кутикулы личинок вощинной огневки под влиянием парализации ядом *H. hebetor* и заражения *M. robertsii* относительно контроля (без заражения и парализации). Разные буквы указывают на статистически значимые различия между вариантами (тест Данна,  $p < 0.05$ ).

Установлено, что яд паразитоидов содержит протеазы, которые могут расщеплять домен рецептора PGRP-LC, индуцирующего IMD каскад, по аналогии с цистеиновой протеазой DERp1 пылевых клещей *Dermatophagoides pteronyssinus* (Warmbold et al., 2013). Это согласуется с выявленной нами иммуномодулирующей ролью яда. Подъем экспрессии генов АМП ранее отмечался и в других системах хозяин-паразитоид, в частности у *Nasonia vitripennis* Walker при паразитировании *Sarcophaga bullata* Parker (Martinson et al., 2014).

Индукция специфических АМП может быть связана с разными аспектами инфекции. Антигрибные пептиды (галиомицин, галлеримицин) активируются, вероятно, непосредственно в ответ на грибной патоген (Wojda, 2017b; 2020; Staćzek et al., 2023). Антибактериальные пептиды (цекропин, гловерин), экспрессия которых также повышается при микозах, могут выполнять двоякую функцию: некоторые цекропины, например, цекропин А, обладают противогрибковой активностью (Manniello et al., 2021; Wang et al., 2023a), но основная их роль, как показано в работе Ванг и соавт. (Wang et al., 2023b), заключается в устранении оппортунистических бактерий. В их эксперименте гриб *M. rileyi* через повышение уровня экдизона индуцировал синтез АМП (цекропин, гловерин, лебоцин) по Toll-пути, что подавляло бактериальную микрофлору.

Полученные данные о максимальной экспрессии генов АМП при сочетанном воздействии гриба и яда хорошо согласуются с рассматриваемой моделью. Интенсивный рост гриба на кутикуле парализованных личинок (Kryukov et al., 2018d, 2022) создаёт мощный стимул для иммунной системы. Косвенным подтверждением служит и максимальная активация фенолоксидазы в кутикуле в этих же условиях (Kryukov et al., 2018d), что указывает на общую активацию гуморальной защиты в ответ на комплексную угрозу.

Как было отмечено выше, парализация вощинной огневки ядом бракона приводит к резкому росту численности аэробных грамположительных *Enterococcus faecalis* на кутикуле (Kryukov et al., 2022) и усилению пролиферации

грамотрицательных факультативно-анаэробных энтеробактерий в кишечнике, что коррелирует с подъёмом уровня АМП в этих тканях (Polenogova et al., 2019). Как энтерококки, так и энтеробактерии являются условными патогенами, способными вызывать септицемию у данного хозяина (Kryukov et al., 2020). Известно, что микозы также часто приводят к увеличению бактериальной нагрузки в кишечнике, на кутикуле или в гемолимфе насекомых в различных модельных системах (Ramirez et al., 2018; Deng et al., 2022; Wang et al., 2022), включая воштинную огневку (Kryukov et al., 2020). Через проколы, сделанные яйцекладом паразитоида, или повреждения кутикулы, вызванные грибом, бактерии могут проникать в гемоцель. Транслокация микробиоты из кишечника в гемоцель описана при микозах у других насекомых (Wei et al., 2017; Wang et al., 2023b). Таким образом, индукция синтеза АМП в ответ на парализацию и грибную инфекцию, вероятно, служит механизмом сдерживания оппортунистических микроорганизмов и предотвращения септицемии, что может способствовать успешному развитию как паразитоида, так и энтомопатогенного гриба.

В нашей работе мы не обнаружили достоверных изменений в экспрессии гена, связанного с генерацией АКМ (NADPH-оксидаза, *nox*), при отдельном воздействии гриба или парализации. Однако комбинированное действие этих факторов вызывало значительное увеличение экспрессии *nox*. Это указывает на то, что парализованные личинки сохраняют способность усиливать окислительные процессы в ответ на грибную инвазию. Поскольку АКМ обладают прямой микробицидной активностью (Wojda, 2017b), активация *nox* может рассматриваться как компонент защиты против грибного патогена и сопутствующих бактериальных инфекций.

Мы зафиксировали значительное увеличение экспрессии гена ингибитора металлопротеаз (*impi*) в кутикуле и жировом теле при парализации, но не в ответ на грибную инфекцию. Это согласуется с литературными данными, показывающими слабую индукцию *impi* при микозах (Dubovskiy et al., 2013a; Vertyporokh et al., 2017). Поскольку и энтомопатогенные грибы, и

эктопаразитоиды секретируют термолизиноподобные протеазы (семейство M4), разрушающие белки гемолимфы (Vogel et al., 2011; Wojda, 2017b), синтез *impi* может быть направлен на нейтрализацию этих чужеродных ферментов.

Парализация также вызывала повышение экспрессии гена ингибитора апоптоза (*iap*), причём максимальный эффект наблюдался при комбинированном воздействии яда и гриба. Ранее был показан индуцированный ядом *H. hebetor* некроптоз в жировой ткани огневки (Kryukova et al., 2021). Одновременно с *iap* парализация приводила к повышению экспрессии гена белка теплового шока *hsp70*, с максимальным уровнем при совместном действии гриба и яда. По данным Мартинсон и соавт. (Martinson et al., 2014) в экспериментальной модели эктопаразитоид *N. vitripennis* – хозяин *S. bullata* белки теплового шока 27, 70, 23 показали значительное повышение экспрессии в ответ на действие яда паразитоида. Ранее Н. Крюкова и соавт. (Kryukova et al., 2021) также регистрировали увеличение экспрессии гена *hsp70* сопровождающееся увеличением экспрессии гена *iap* в тканях жирового тела личинок *G. mellonella* под воздействием яда *H. hebetor*. Эволюционно консервативный шаперон Hsp70 способствует выживанию клеток при стрессе и ингибирует апоптоз, в том числе стабилизируя белки IAP (Kocab, Duckett, 2016; Vasilikos et al., 2017).

Таким образом, мы показываем, что парализованные ядом личинки огневки являются не просто субстратом для развития паразитоида или микроорганизмов, а активно реагируют на вторжение патогенов подъемом гуморального иммунитета. Мы полагаем, что индукция исследуемых нами генов препятствует размножению оппортунистических микроорганизмов и поддерживает гомеостаз белков. Однако эти реакции не "спасают" личинок *G. mellonella* от более специализированных паразитов *Metarhizium*. Соответственно, изменения в экспрессии генов иммунного ответа хозяина в данной системе могут работать в пользу паразитов: способствовать успешному развитию личинок *H. hebetor* и грибов *Metarhizium* на парализованном хозяине.

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

Ранее было показано, что природный микотоксин, синтезируемый грибами *Alternaria*, тенуазоновая кислота (ТК) токсична для различных групп насекомых и может снижать их выживаемость при инъекциях или после скармливания (Kaur et al., 2015; Salimova et al., 2021). Однако реакции иммунитета насекомых и их восприимчивость к патогенам под действием тенуазоновой кислоты не анализировались. В данном разделе работы мы оценили дозозависимые эффекты в экспрессии генов вошинной огневки при скармливании различных концентраций данного соединения. Количество КОЕ бактериальных симбионтов огневки и изменения в восприимчивости к грибам *B. bassiana* были также проанализированы.

#### **3.3.1. Влияние тенуазоновой кислоты на общие физиологические показатели личинок *Galleria mellonella* и восприимчивость к *Beauveria bassiana***

Тенуазоновая кислота в тестируемых концентрациях (0.2, 1 и 5 мг/г среды), не приводила к изменениям в выживаемости огневки ( $\chi^2 < 3.09$ ,  $p > 0.08$  по сравнению с контролем). В частности, выживаемость в контрольной группе составила 98% на 10-й день, а минимальная выживаемость составила 88% на 10-й день после скармливания корма с самой высокой концентрацией ТК (5 мг/г среды).

Зафиксирована задержка роста личинок вошинной огневки при потреблении корма с ТК во всех концентрациях уже на 2-й день (тест Тьюки,  $p < 0.001$  по сравнению с контролем). В последующие дни происходило полное прекращение роста личинок, получавших ТК в дозах 1.0 и 5 мг/г среды. Личинки, получавшие самую низкую концентрацию (0.2 мг/г среды), набирали вес до уровня контрольных личинок на 6-10-й день после скармливания корма с ТК (тест Тьюки,  $p > 0.08$  по сравнению с контролем).

Потребление корма с ТК личинками *G. mellonella* повысило количество КОЕ энтерококков в среднем кишечнике (рис. 8, А), хотя существенное повышение в 4.5 раза по сравнению с контролем (тест Данна,  $p = 0.004$ ) было обнаружено только в ответ на самую высокую концентрацию (5 мг/г среды).

При скармливании ТК в концентрации 1 мг/г среды у личинок повышалась восприимчивость к грибу *B. bassiana*. Синергетический эффект в смертности регистрировался с 3 по 8 сутки после заражения грибом и обработкой ТК (рис. 8, Б). Микоз заканчивался классическим спороношением на трупах.

### **3.3.2. Анализ экспрессии генов иммунного ответа у личинок *Galleria mellonella* при скармливании тенуазоновой кислоты**

Показано, что ТК вызывала зависимое от концентрации снижение экспрессии гена *nox* в тканях среднего кишечника и жирового тела (рис. 9). Существенные различия в 1.6–2.9 раза зарегистрированы для концентраций ТК 1 и 5 мг/г среды (тест Данна,  $p < 0.02$  по сравнению с контролем).

Аналогичные изменения были выявлены для гена цекропина в обеих тканях и для лизоцима в среднем кишечнике (рис. 9), тогда как в жировом теле экспрессия лизоцима повышалась в 1.6 раза при применении наименьшей концентрации кислоты ( $p = 0.04$  по сравнению с контролем). Экспрессия гена гловерина снижалась в 2.6 раза в среднем кишечнике под влиянием кислоты, но только в наименьшей концентрации ( $p = 0.02$  по сравнению с контролем). В жировом теле экспрессия гловерина повышалась в 2.6 – 2.7 раза ответ на применение ТК в концентрациях 1 и 5 мг/г среды ( $p < 0.015$  по сравнению с контролем). Гены, кодирующие противогрибные пептиды, галиомицин и галлеримицин показали усиление экспрессии в обеих тканях, зависимое от концентрации ТК. Достоверные эффекты ( $p < 0.05$ ) наблюдались при промежуточной и наибольшей концентрациях (1 и 5 мг/г среды) и достигали увеличения в 2.5–7.0 раза по сравнению с контролем.

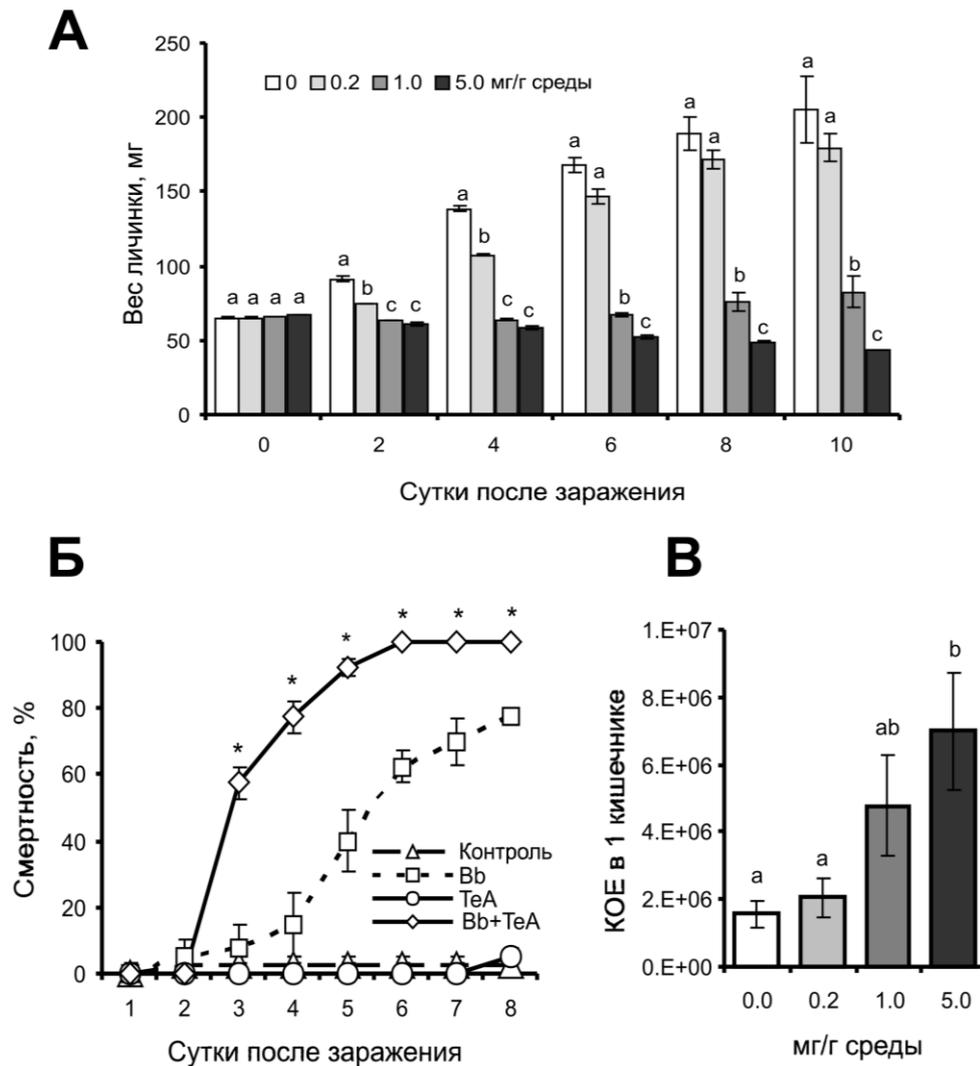


Рисунок 8. (А) – изменение веса личинок *G. mellonella* после скармливания tenuazonовой кислоты в концентрации 0.0 (контроль), 0.2, 1.0 или 5.0 мг/г среды. Разные буквы указывают на статистически значимые различия между вариантами (тест Тьюки,  $p < 0.05$ ). (Б) – воздействие скармливания tenuazonовой кислоты (1 мг/г среды) и топикальной инфекции *B. bassiana* (Bb) на смертность личинок воцинной огневки. \* синергетический эффект ( $p < 0.05$ ), рассчитанный для каждого суток. (В) – изменения в количестве энтерококков в среднем кишечнике личинок через 48 часов после скармливания tenuazonовой кислоты в концентрации 0.0 (контроль), 0.2, 1.0 или 5.0 мг/г среды. Разные буквы указывают на статистически значимые различия между вариантами (тест Данна,  $p < 0.05$ ).

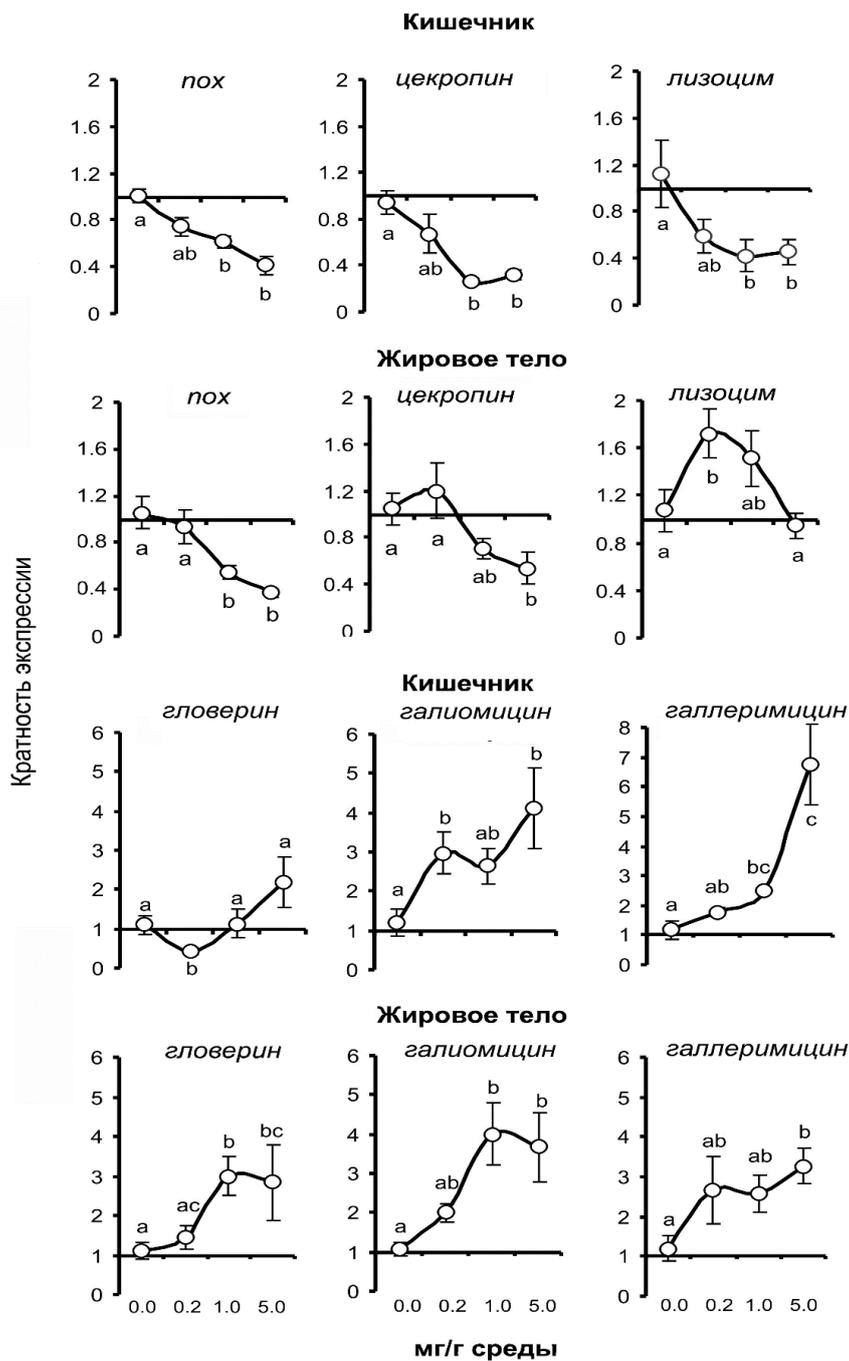


Рисунок 9. Экспрессия генов, связанных с продукцией АМП и АКМ в среднем кишечнике и жировом теле воцинной огневки через 48 часов после начала питания ТК в концентрации 0.0 (контроль), 0.2, 1.0 или 5.0 мг/г среды. Показана кратность экспрессии относительно нулевой концентрации (контроль). Разные буквы указывают на статистически значимые различия между вариантами (тест Данна,  $p < 0.05$ ).

Таким образом, пероральное действие ТК вызывает у воцинной огневки подавление иммунных реакций в среднем кишечнике, в частности, снижение

экспрессии генов *nox*, лизоцима и цекропина. Эти нарушения сопровождаются замедлением роста личинок и увеличением КОЕ энтерококков в кишечнике.

ТК известна своей цитотоксичностью в отношении клеток млекопитающих, включая клетки кишечного эпителия и гепатоциты (Den Hollander et al., 2022). Основные механизмы её действия включают ингибирование синтеза белков на рибосомах и нарушение высвобождения пептидов (Carrasco and Vazquez, 1973), также было показано, что ТК снижает митохондриальную активность и подавляет пролиферацию клеток (Zhou and Qiang, 2008).

Эти данные хорошо согласуются с наблюдаемой нами задержкой роста личинок, которую можно объяснить именно ингибированием синтеза белка и клеточной пролиферации. Однако остаётся неясным, каким образом ТК влияет на экспрессию генов, связанных с АКМ и АМП.

Известно, что НАДФН-оксидазы (NOX/DUOX) продуцируют АКМ и играют ключевую роль в защите от кишечных патогенов и поддержании микробного гомеостаза (Kim, Lee, 2014; Sajjadian, Kim, 2020). Ингибирование этих систем приводит к снижению продукции АКМ, неконтролируемому размножению микроорганизмов и повышению восприимчивости хозяина к инфекциям (Xiao et al., 2017; Sajjadian, Kim, 2020). Можно предположить, что снижение экспрессии гена *nox* является одной из причин увеличения численности бактерий в кишечнике личинок *G. mellonella*. Лизоцим и цекропин обладают активностью против грамположительных бактерий (Van Herreweghe & Michiels 2012; Баландин, Овчинникова, 2016), соответственно, снижение их экспрессии также коррелировало с ростом популяции энтерококков. Важно отметить, что увеличение бактериальной нагрузки может быть также следствием замедления перистальтики кишечника, что наблюдалось ранее под действием других токсинов (Polenogova et al., 2019; Noskov et al., 2021). Интересно, что, в отличие от данных *in vitro*, где экстракты, содержащие ТК, или сама кислота подавляли рост бактерий (Crudo et al., 2021), в нашей системе *in vivo* ТК не оказывала

прямого антибактериального действия на грамположительные бактерии, а, напротив, способствовала их размножению.

В ходе работы также было показано, что ТК снижает экспрессию генов *nox* и цекропина в жировом теле, но при этом усиливает экспрессию генов галлеримицина и галиомицина в кишечнике и жировом теле, а также гена гловерина в жировом теле. Индукция этих АМП может быть неспецифическим ответом на сам токсин или на вызванное им увеличение численности энтерококков.

Несмотря на активацию некоторых противогрибных защитных механизмов, личинки, получавшие ТК, были более восприимчивы к инфекции *B. bassiana*. По всей видимости, ключевой причиной здесь является задержка развития личинок. Замедление роста приводит к истончению кутикулы и отсрочке линьки, что облегчает проникновение грибных гифальных тел в гемоцель. Кроме того, снижение экспрессии гена *nox* в жировом теле может ослабить противогрибную защиту, поскольку продукция АКМ важна для инактивации спор грибов (Butt et al., 2016). Усиление регуляции гена *nox* в жировом теле *G. mellonella* в ответ на грибную инфекцию было задокументировано и в других экспериментальных моделях (см. раздел 3.4.). Еще одной причиной повышения восприимчивости личинок к грибной инфекции может быть повышение численности энтерококков в кишечнике огневки, как было показано Polenogova et al. (2019). Механизм описанного авторами явления остается не изученным.

Таким образом, ТК в исследованных концентрациях не является смертельной для личинок вощинной огневки, но вызывает серьезные нарушения, дисфункцию иммунной системы, ухудшение питания, усиленную пролиферацию бактериальных ассоциантов в кишечнике и повышение восприимчивости к грибным патогенам, проникающим через кутикулу. Усиление экспрессии антибактериальных пептидов лизоцима и гловерина в жировом теле может препятствовать размножению бактерий в полости тела, тем самым поддерживать развитие классического микоза. Полученные результаты позволяют

рассматривать ТК в качестве перспективного синергиста энтомопатогенных грибов для биологической защиты технических или лесных культур.

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

Известно, что восприимчивость насекомых к грибным и бактериальным инфекциям значительно зависит от условий окружающей среды, в частности от температур (Mowlds, Kavanagh, 2008; Petersen et al., 2013 и мн. др.). Однако работы о вовлеченности бактериальных симбионтов в развитие микозов у насекомых при разных температурах нам не известны. В данном разделе работы мы оценили параметры иммунитета и уровень пролиферации симбиотических бактерий у вошинной огневки в условиях развития микоза при разных температурах: 15 °С (факультативная диапауза) и 25 °С (активное состояние). В качестве инфекционного агента был взят гриб *S. militaris* ввиду его психротолерантности и слабого антагонизма по отношению к бактериям (Кругиков et al., 2018a, 2020). В отличие от предыдущих экспериментов, где использовалось перкутикулярное заражение, в данной работе использованы инъекции грибных пропагул, поскольку пути заражения хозяев грибом *S. militaris* пока не изучены и модели естественного заражения не отработаны.

#### **3.4.1. Развитие микоза *Cordyceps militaris* и сочетанной инфекции у вошинной огневки при различных температурах**

Установлено, что при заражении вошинной огневки грибом *S. militaris*, в условиях 15 °С и 25 °С наблюдалась 80–100% гибель через 7-10 дней (рис. 10, А). Более быстрая гибель наблюдалась при 15 °С по сравнению с 25 °С (логранк тест,  $\chi^2 > 9.6$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.002$ ). В структуре смертности при 15 °С преобладал микоз, а при 25 °С – бактериозы (рис. 10, Б). Кроме того, при температуре 25 °С от 10 до 20 % личинок были способны преодолеть инфекцию и завершить метаморфоз.

Микроскопия гемолимфы показала одновременное присутствие гифальных тел и кокков в гемолимфе инфицированных насекомых, которых инкубировали при 25 °С (рис. 10, Г), однако кокки не детектировались в гемолимфе при 15 °С. При 15 °С в 94-100% случаев формировались мумифицированные трупы (рис. 10, Б, Д).

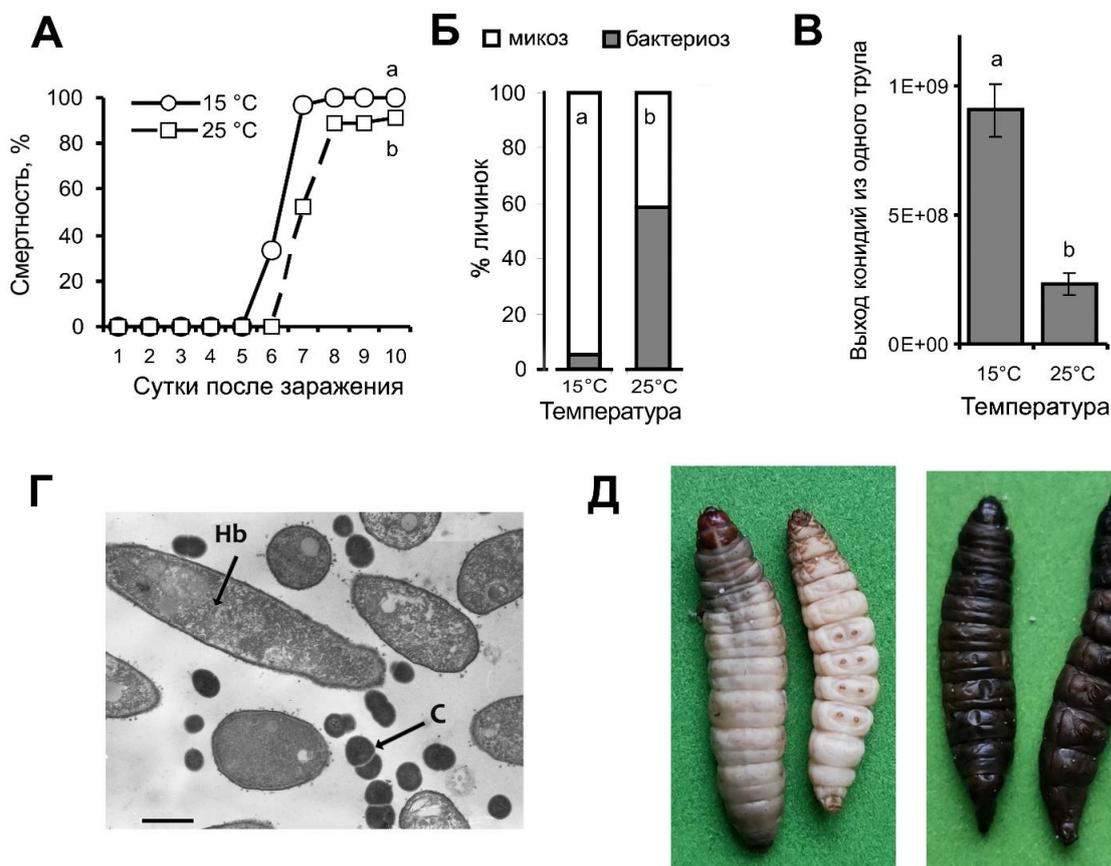


Рисунок 10. (А) – динамика смертности и исход заражения личинок *G. mellonella* после инъекций *C. militaris* (2500 конидий на одну личинку) и последующей инкубации при температурах 15 °С и 25 °С (разные буквы указывают на статистически значимые различия, определенные с помощью логранк теста,  $\chi^2 > 9.6$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.002$ ); (Б) — процент мумифицированных и разложившихся личинок в процессе развития микоза при разных температурах (разные буквы указывают на статистически значимые различия,  $\chi^2 > 8.7$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.003$ ); (В) – урожайность конидий *C. militaris* на мумифицированных трупах при 15 °С и 25 °С (разные буквы указывают на статистически значимые различия,  $t = 6.1$ ,  $df = 8$ ,  $p < 0.001$ ); (Г) — гифальные тела *C. militaris* (*Hb*) и кокки (*C*) в гемолимфе *G. mellonella* через 5 суток после заражения грибом, масштабная линейка — 1 мкм; (Д) – общий вид личинок *G. mellonella*, погибших после заражения конидиями *C. militaris*: мумификация (слева) и бактериальное разложение (справа).

Повышенная температура (25 °С) способствовала преобладанию процесса бактериального разложения ( $\chi^2 > 8.7$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.003$  по сравнению с 15 °С). Кроме того, урожайность конидий на мумифицированных трупах при 25 °С уменьшилось в 2.5 раза по сравнению с 15 °С ( $t = 6.1$ ,  $df = 8$ ,  $p < 0.001$ , рис. 10, В). Таким образом, насекомые были менее восприимчивы к инфекции *S. militaris* при 25 °С, но они были более предрасположены к спонтанным бактериальным инфекциям по сравнению с насекомыми, инкубируемыми при 15 °С.

### **3.4.2. Анализ изменения бактериальных сообществ в тканях личинок *Galleria mellonella* при различных температурах**

Из гемолимфы контрольных личинок при обеих температурах высевались лишь отдельные колонии энтерококков (желчно-эскулиновый агар) и энтеробактерий (эндо агар) (рис. 11). При 15 °С микоз не приводил к существенным изменениям в количестве КОЕ (тест Данна,  $p > 0.17$  по сравнению с контролем). Напротив, при 25 °С количество КОЕ как энтеробактерий, так и энтерококков увеличилось в гемолимфе в 39-54000 раз в ответ на заражение *S. militaris* ( $p < 0.002$  по сравнению с контролем). Существенное взаимодействие между факторами инфекция и температура было зарегистрировано для энтеробактерий ( $H_{1,19} = 9.4$ ,  $p = 0.002$ ). Однако для энтерококков такого взаимодействия обнаружено не было ( $H_{1,19} = 1.5$ ,  $p = 0.23$ ).

В среднем кишечнике наблюдали повышение количества КОЕ энтеробактерий и энтерококков в ответ на фактор грибной инфекции (энтеробактерии:  $H_{1,19} = 4.2$ ,  $p = 0.04$ ; энтерококки:  $H_{1,19} = 8.5$ ,  $p = 0.004$ ). Однако существенное повышение КОЕ обеих групп бактерий наблюдалось только при 25 °С (в 4-7 раз по сравнению с контролем, тест Данна,  $p < 0.04$ , рис. 11). Влияние фактора температуры в среднем кишечнике на количество КОЕ не было существенным, однако отмечена тенденция к увеличению количества энтерококков при 15 °С по сравнению с 25 °С ( $H_{1,23} = 2.7$ ,  $p = 0.09$ ).

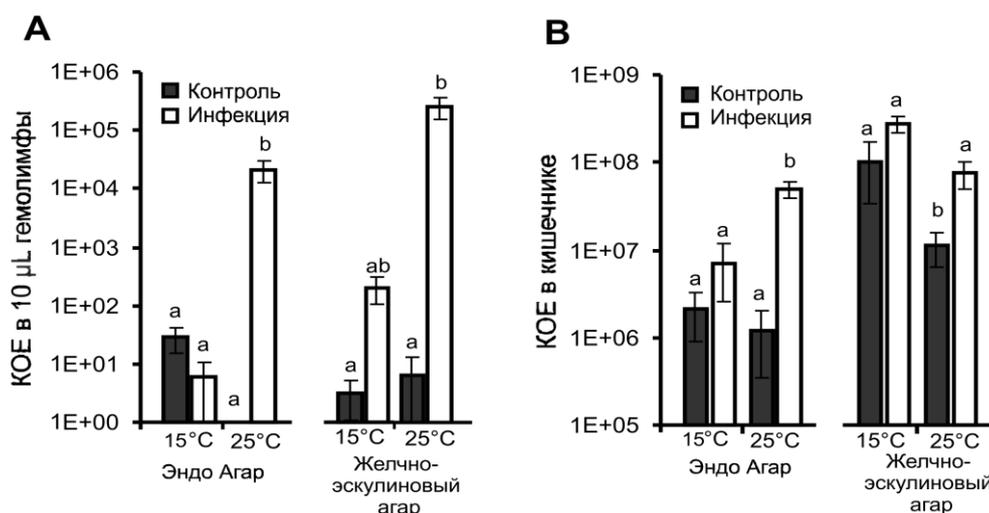


Рисунок 11. Количество КОЕ бактерий в гемолимфе и среднем кишечнике личинок *G. mellonella* через 96 часов после инъекции *C. militarum* (2500 конидий на личинку) с последующей инкубацией при 15 °C и 25 °C (разные буквы показывают на статистически значимые различия для определенной среды и ткани, тест Данна:  $p < 0.05$ ).

Метабаркодинг (16S rRNA) бактериально разложившихся трупов показал, что структура их бактериальных сообществ представлена либо моносообществом *Enterococcus* sp. (относительное обилие – 98%), либо неклассифицированными *Enterobacteriaceae* (относительное обилие – 99%).

### 3.4.3. Анализ экспрессии генов иммунного ответа в тканях личинок *Galleria mellonella* при различных температурах

Под влиянием грибной инфекции происходило значительное усиление экспрессии исследуемых генов АМП как в жировом теле, так и в среднем кишечнике (рис. 12, табл. 3). Мы наблюдали более сильную экспрессию генов противогрибных пептидов (галиомицин, галлеримицин) в ответ на инфекцию при 25 °C по сравнению с 15 °C в обеих тканях. Напротив, гены антибактериальных пептидов (гловерин, цекропин, лизоцим) имели тенденцию к более высокой экспрессии при 15 °C по сравнению с 25 °C. В частности, в ответ на инфекцию экспрессия гена антигрибного пептида галлеримицина в жировом теле была

увеличена в 77 раз при 25 °С, но только в 12 раз при 15 °С по сравнению с неинфицированными насекомыми (тест Данна,  $p < 0.0005$  и  $p = 0.10$  соответственно). Регуляция гена галиомицина в жировом теле увеличилась в 18 раз при 25 °С, но только в 8 раз при 15°С ( $p = 0.001$  и  $p = 0.04$  по сравнению с контролем, соответственно; рис. 12).

Таблица 3. Двухфакторные эффекты инфекции *S. militaris* и температуры на экспрессию генов АМП у личинок воцинной огневки. Существенные эффекты выделены жирным шрифтом. Стрелки показывают повышение экспрессии для существенных ( $p < 0.05$ ) и пограничных ( $p = 0.05-0.10$ ) эффектов.

Гены	Эффекты		
	Инфекция	Температура	Взаимодействие факторов
<b>Жировое тело</b>			
Галиомицин	<b>↑<math>H_{1,19} = 14.3, P &lt; 0.001</math></b>	$H_{1,19} = 0.0, P = 1.00$	$H_{1,19} = 0.7, P = 0.40$
Галлеримицин	<b>↑<math>H_{1,19} = 14.3, P &lt; 0.001</math></b>	$H_{1,19} = 0.0, P = 0.88$	$H_{1,19} = 2.1, P = 0.15$
Гловерин	<b>↑<math>H_{1,19} = 14.3, P &lt; 0.001</math></b>	$H_{1,19} = 1.5, P = 0.23$	$H_{1,19} = 0.1, P = 0.82$
Цекропин	$H_{1,19} = 3.3, P = 0.08$	<b>↑<math>H_{1,19} = 3.9, P = 0.05</math></b>	$H_{1,19} = 0.1, P = 0.76$
Лизоцим	<b>↑<math>H_{1,23} = 12.8, P &lt; 0.001</math></b>	$↑H_{1,23} = 3.2, P = 0.07$	$H_{1,23} = 0.1, P = 0.77$
<b>Средний кишечник</b>			
Галиомицин	<b>↑<math>H_{1,19} = 10.1, P = 0.002</math></b>	$H_{1,19} = 1.2, P = 0.29$	$H_{1,19} = 1.3, P = 0.27$
Галлеримицин	<b>↑<math>H_{1,19} = 14.3, P &lt; 0.001</math></b>	$H_{1,19} = 0.1, P = 0.76$	$H_{1,19} = 2.5, P = 0.11$
Гловерин	<b>↑<math>H_{1,19} = 6.2, P = 0.01</math></b>	$H_{1,19} = 0.2, P = 0.65$	$H_{1,19} = 0.0, P = 0.88$
Цекропин	$H_{1,23} = 1.2, P = 0.27$	$H_{1,23} = 1.0, P = 0.33$	$H_{1,23} = 0.5, P = 0.49$
Лизоцим	<b>↑<math>H_{1,23} = 9.4, P = 0.002</math></b>	<b>↓<math>H_{1,23} = 4.6, P = 0.03</math></b>	$H_{1,23} = 1.1, P = 0.30$

Экспрессия гена антибактериального пептида гловерина в жировом теле в ответ на грибную инфекцию увеличивалась в 55 раз при 15 °С ( $p = 0.005$  по сравнению с контролем) и только в 17 раз при 25 °С ( $p = 0.01$  по сравнению с контролем). Для генов цекропина и лизоцима мы наблюдали повышенную экспрессию в жировом теле при 15 °С по сравнению с 25 °С в целом (влияние температуры,  $H_{1,19} = 3.9, p = 0.05$  и  $H_{1,23} = 3.2, p = 0.07$  соответственно), и более активная экспрессия в ответ на грибную инфекцию также наблюдалась при низкой температуре (рис. 12, табл. 3). Изменения в экспрессии генов гловерина, цекропина и лизоцима в среднем кишечнике были менее выражены, чем в

жировом теле. Регуляция гена гловерина в среднем кишечнике увеличилась в 2.8-3 раза в ответ на грибную инфекцию ( $H_{1,19} = 6.2$ ,  $p = 0.01$ ) независимо от температуры. Экспрессия цекропина в среднем кишечнике существенно не изменялась. Экспрессия гена лизоцима в среднем кишечнике снижалась при 15 °C по сравнению с 25 °C ( $H_{1,23} = 4.6$ ,  $p = 0.03$ ), однако значительное усиление регуляции в ответ на инфекцию *C. militaris* происходило только при 15 °C (в 6 раз,  $p = 0.004$  по сравнению с контролем), но не при 25 °C (в 2 раза,  $p = 0.15$  по сравнению с контролем).

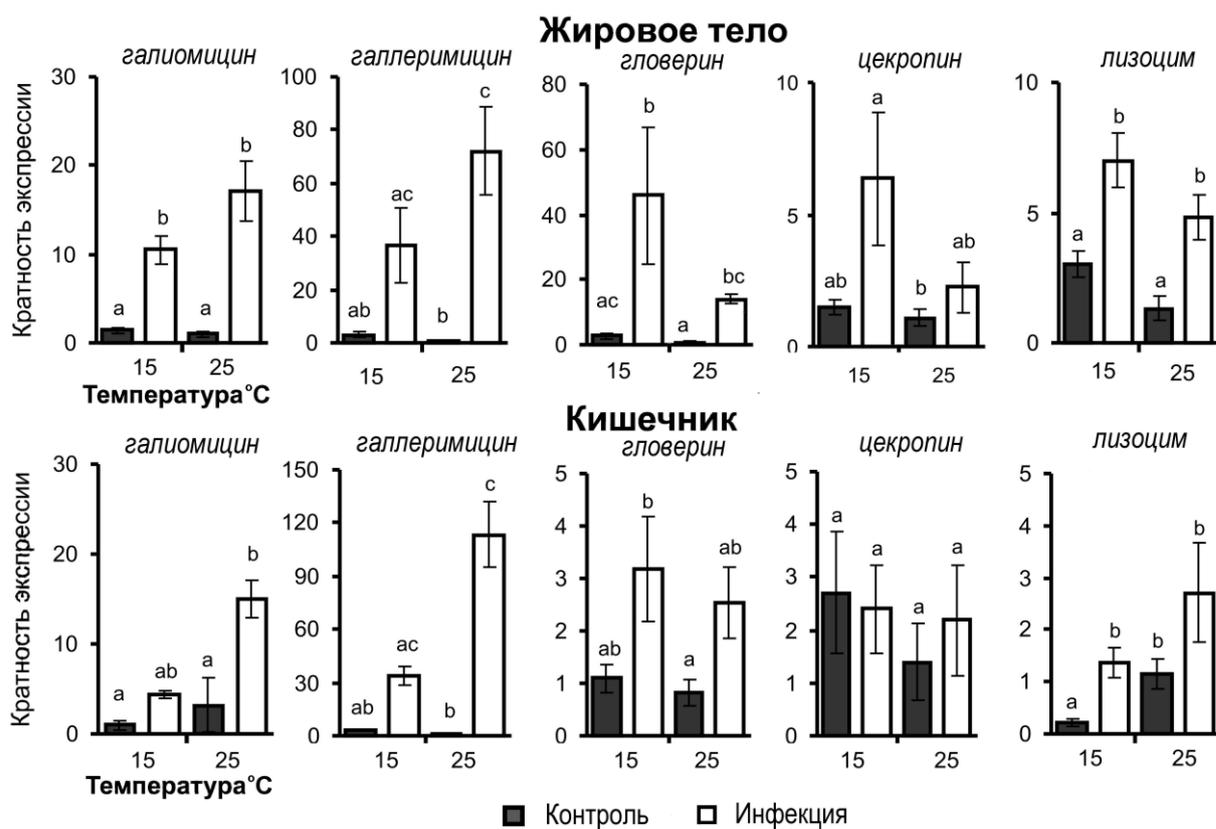


Рисунок 12. Экспрессия генов антимикробных пептидов в жировом теле и среднем кишечнике личинок воцинной огневки через 96 ч после инъекции *C. militaris* и последующей инкубации при 15 °C и 25 °C. Представлены изменения относительно контроля при 25 °C. Разные буквы указывают на статистически значимые различия между вариантами (тест Данна,  $p < 0.05$ ).

Ген *iap* повышал регуляцию в жировом теле в ответ на грибную инфекцию только при низкой температуре на уровне маргинальной значимости (тест Данна,

$p = 0.07$  по сравнению с контролем, рис. 13, табл. 4). При 25 °С экспрессия этого гена в ответ на инфекцию не изменялась ( $p = 0.5$  по сравнению с контролем). В среднем кишечнике изменения в регуляции гена *iap* были вызваны только инфекцией ( $H_{1,23} = 7.7$ ,  $p = 0.006$ ), но не температурой. Значительное усиление регуляции в ответ на *S. militaris* также было зарегистрировано только при 15 °С ( $p = 0.04$  по сравнению с контролем). Экспрессия *nox* незначительно повышалась в жировом теле в ответ на грибную инфекцию при обеих температурах ( $H_{1,23} = 4.2$ ,  $p = 0.04$ ), но влияние температуры не было значительным.

Таблица 4. Двухфакторные эффекты инфекции *S. militaris* и температуры на экспрессию генов АКМ и генов, связанных со стрессом у личинок воцинной огневки. Существенные эффекты выделены жирным шрифтом. Стрелки показывают повышение и понижение экспрессии для существенных ( $p < 0.05$ ) и пограничных ( $p = 0.05-0.10$ ) эффектов.

Гены	Эффекты		
	Инфекция	Температура	Взаимодействие факторов
Жировое тело			
IAP	$H_{1,23} = 0.8$ , $P = 0.39$	<b><math>\uparrow H_{1,23} = 7.4</math>, <math>P = 0.007</math></b>	$H_{1,23} = 3.0$ , $P = 0.08$
NOX-DUOX	<b><math>\uparrow H_{1,23} = 4.3</math>, <math>P = 0.04</math></b>	$H_{1,23} = 0.6$ , $P = 0.45$	$H_{1,23} = 0.0$ , $P = 0.86$
Hsp70	<b><math>\downarrow H_{1,23} = 4.6</math>, <math>P = 0.03</math></b>	<b><math>\uparrow H_{1,23} = 14.5</math>, <math>P &lt; 0.001</math></b>	$H_{1,23} = 0.0$ , $P = 0.95$
Hsp90	$\uparrow H_{1,23} = 2.8$ , $P = 0.09$	$H_{1,23} = 0.3$ , $P = 0.56$	$H_{1,23} = 0.1$ , $P = 0.77$
Средний кишечник			
IAP	<b><math>\uparrow H_{1,23} = 7.7</math>, <math>P = 0.006</math></b>	$H_{1,23} = 0.0$ , $P = 0.91$	$H_{1,23} = 0.0$ , $P = 0.91$
NOX-DUOX	$H_{1,23} = 1.8$ , $P = 0.18$	<b><math>\downarrow H_{1,23} = 6.2</math>, <math>P = 0.01</math></b>	$H_{1,23} = 1.3$ , $P = 0.25$
Hsp70	$H_{1,23} = 0.0$ , $P = 0.93$	<b><math>\uparrow H_{1,23} = 13.7</math>, <math>P &lt; 0.001</math></b>	$H_{1,23} = 0.1$ , $P = 0.71$
Hsp90	$H_{1,23} = 0.2$ , $P = 0.64$	<b><math>\uparrow H_{1,23} = 8.7</math>, <math>P = 0.003</math></b>	$H_{1,23} = 0.8$ , $P = 0.39$

Экспрессия генов теплового шока *hsp 70* и *hsp 90* была повышенной при низкой температуре (за исключением *hsp 90* в жировом теле, рис. 13). Влияние грибной инфекции отмечено только для *hsp 70* в жировом теле и было направлено в сторону снижения экспрессии ( $H_{1,23} = 4.6$ ,  $p = 0.03$ ). В среднем кишечнике повышение уровня *hsp 70* также наблюдалось при 15 °С ( $H_{1,23} = 13.7$ ,  $p < 0.001$ ), но грибная инфекция не оказывала существенного влияния. Активация гена *hsp90* в жировом теле в ответ на инфекцию была незначительной и не зависела от

температуры. В среднем кишечнике экспрессия гена повышалась только при низкой температуре ( $H_{1,23} = 8.7$ ,  $p = 0.003$ ), без достоверного влияния в ответ на *C. militaris*.

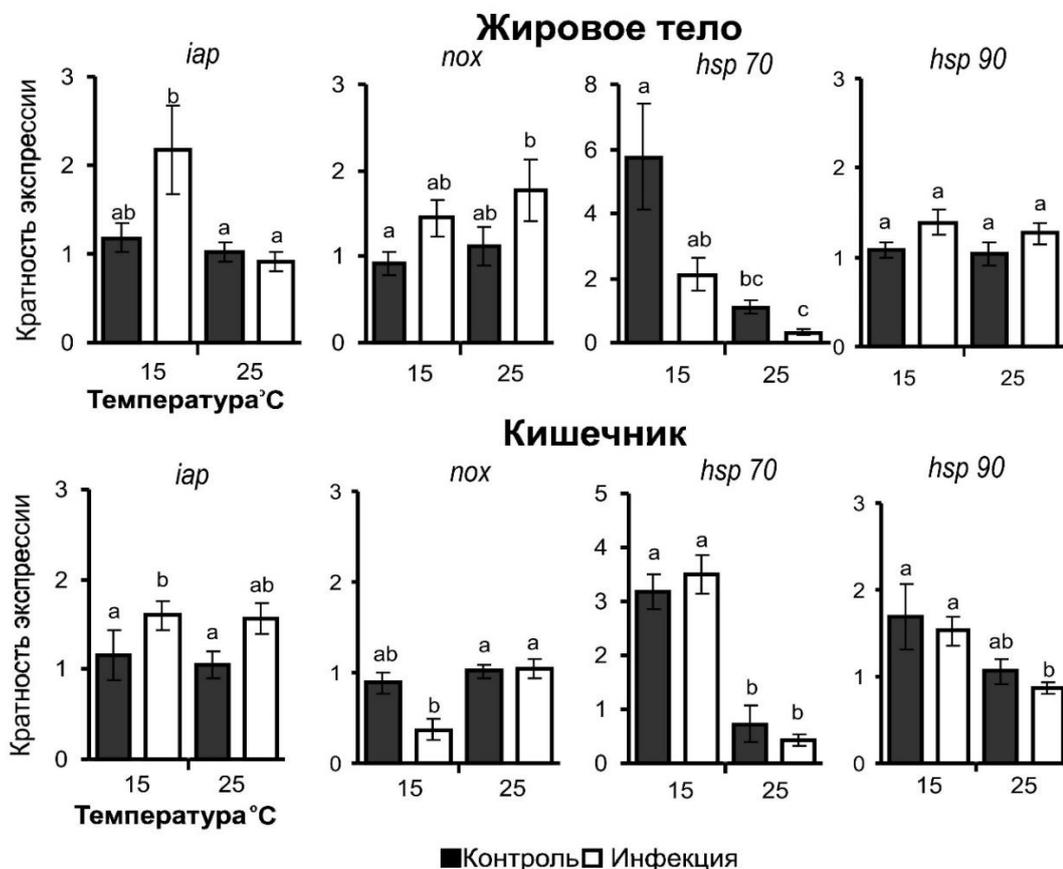


Рисунок 13. Экспрессия генов ингибитора апоптоза (*iap*), НАДФН-оксидазы (*nox*) и белков теплового шока (*hsp 70*, *hsp 90*), в жировом теле и среднем кишечнике личинок воцинной огневки через 96 ч после инъекции *C. militaris* и последующей инкубации при 15 °C и 25 °C. Представлены изменения относительно контроля при 25 °C. Разные буквы указывают на статистически значимые различия между вариантами (тест Данна,  $p < 0.05$ ).

Таким образом, на системе *C. militaris* – *G. mellonella* в условиях разных температур продемонстрированы взаимодействия между грибом и бактериальными ассоциантами хозяина. Развитие *C. militaris* у личинок воцинной огневки протекало эффективнее при 15°C, чем при 25°C. При более высокой температуре вирулентность гриба снижалась, но резко возрастала частота

спонтанных бактериозов, обусловленных размножением в гемолимфе энтерококков и энтеробактерий. Следует отметить, что *C. militaris* является более слабым конкурентом бактерий по сравнению с *Metarhizium* и *Beauveria* в экспериментах *in vitro* (Kryukov et al., 2020), что также согласуется с его более узкими условиями культивирования *in vivo* (Sato, Shimazu, 2002). Описанные ранее случаи бактериоза после заражения *C. militaris* (Kryukov et al., 2012; 2015; 2018a) также позволяют предположить, что этот гриб обладает ограниченной способностью подавлять бактерий-симбионтов хозяина вследствие более узких экологических требований, включая температурный оптимум. *C. militaris* приспособлен развиваться главным образом на зимующих насекомых в лесной подстилке и почве (Kryukov et al., 2011). Вероятно, для успешного развития *C. militaris* в хозяевах ему требуются низкие температуры для избегания антагонизма с бактериальными ассоциантами хозяина. Низкая температура (15 °C), неблагоприятная для размножения многих бактерий, ограничивает их влияние на патогенез, что может дополнительно поддерживаться более сильными антибактериальными реакциями хозяина при этих условиях.

Во время инфекции мы наблюдали увеличение бактериальной нагрузки (КОЕ) в среднем кишечнике, что подтверждает результаты, полученные на других моделях грибной инфекции (Wei et al., 2017; Ramirez et al., 2018; Kryukov et al., 2021b). Этот рост может быть следствием нарушения функций кишечника или ре-приоритизации иммунной регуляции. Однако значительное увеличение численности энтерококков и энтеробактерий в ответ на грибную инфекцию происходило только при 25 °C, но не при 15 °C.

Важно, что при 25 °C была выше экспрессия противогрибных пептидов, таких как галлеримицин и галиомицин, в том числе в среднем кишечнике, что может указывать на системный ответ к *C. militaris* или локальное поражение тканей бактериальными и грибными ассоциантами. В то же время при 15 °C в жировом теле активнее экспрессировались гены антибактериальных пептидов, таких как гловерин, цекропин, лизоцим, что коррелировало с отсутствием

бактериальной инвазии гемоцели. Сходная индукция антибактериальной защиты у двукрылых и чешуекрылых при охлаждении отмечалась и ранее (Salehipourshirazi et al., 2017; Chen et al., 2019). Повышение экспрессии генов гловерина и лизоцима в среднем кишечнике в ответ на инфекцию, вероятно является реакцией на возросшую бактериальную нагрузку, как показано в исследованиях на комарах (Ramirez et al., 2018). Однако четкой температурной зависимости для этих изменений в кишечнике мы не выявили. Активация гена *iap* в жировом теле наблюдалась только при 15 °C и коррелировала с усиленным антибактериальным ответом. Поскольку *iap* ассоциирован с путем IMD и необходим для эффективной защиты от грамотрицательных бактерий (Leulier et al., 2006; Zhang et al., 2020), его отсутствие экспрессии при 25 °C также могло способствовать пролиферации бактерий в гемолимфе.

Как и ожидалось, при низкой температуре отмечалась повышенная регуляция генов теплового шока (*hsp 70*, *hsp 90*), что характерно для холодовой адаптации насекомых (Cheng et al., 2016). При этом экспрессия *hsp 70* в жировом теле в ответ на инфекцию *S. militaris* снижалась. Противоречивые данные об экспрессии белков теплового шока при грибных инфекциях (Wrońska, Boguś, 2020; Noskov et al., 2021) могут быть связаны с видоспецифичными особенностями патогенезов.

Обобщая вышесказанное, мы впервые показали, что вовлеченность бактериальных симбионтов хозяина в процесс развития микоза зависит от температуры. Условия пониженных температур менее благоприятны для развития бактерий, что дает преимущество грибу. Кроме того, в условиях пониженных температур наблюдается более сильный ответ со стороны антибактериальных систем и повышение базового уровня экспрессии генов фолдинговых белков. При повышенных температурах наблюдается более сильный ответ со стороны антигрибных, но не антибактериальных систем. Это дает возможность части насекомых преодолеть грибную инфекцию, но в то же время создает высокий риск развития сопутствующих бактериозов, приводящих к септицемии и последующему бактериальному распаду насекомых.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В недавних исследованиях было показано, что грибные инфекции могут приводить к усиленной пролиферации симбиотических бактерий хозяина, миграциям бактерий между тканями, что ускоряет развитие 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 размножение симбионтов хозяев с помощью токсинов (Fan et al., 2017; Sun et al., 2022) или путём индукции АМП в тканях хозяина (Wang et al., 2023b), 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.

Мы впервые оценили вовлеченность симбиотических бактерий в развитие микозов у вошинной огневки и колорадского жука под действием разных средовых факторов, и вклад реакций гуморального иммунитета в развитие сочетанных инфекций у указанных видов. В частности, мы показали зависимость между дозой патогена и исходом инфекции у личинок колорадского жука. При высокой дозе конидий наблюдалась острая инфекция с быстрой гибелью хозяев, но без последующего спорообразования гриба. При низкой инфекционной нагрузке развитие микоза приобретало затяжной характер и гибель наступала медленнее, в большинстве случаев сопровождаясь успешным спорулированием на мумифицированных трупах. Ключевым фактором в данной модели оказалось массовое проникновение оппортунистических бактерий в гемоцель при острой инфекции, что вызывало фатальную септицемию. Данные по экспрессии генов иммунитета показали, что острая инфекция не позволяла хозяину полноценно активировать антимикробные системы, что давало преимущество быстро размножающимся бактериям над паразитическим грибом. Таким образом для успешного развития гриба необходимо медленное течение микоза с индукцией

антибактериальных систем защиты хозяина в определенное время и в определенных тканях.



Рисунок 14. Обобщенная схема эффекта инфекционной нагрузки *B. bassiana* на развитие грибного и сочетанного патогенезов у личинок колорадского жука *L. decemlineata*.

Нами получены уникальные данные по воздействию яда паразитоида *H. hebetor* и грибной инфекции на активацию экспрессии генов иммунного ответа у вощинной огневки. Установлено, что парализованные личинки сохраняют высокий уровень гуморального иммунитета и активно реагируют на проникновение патогенов. При совместном действии яда и гриба наблюдался максимальный подъём уровня экспрессии генов иммунитета. Это свидетельствует о том, что реакции иммунитета парализованного хозяина благоприятствуют развитию паразитоида или энтомопатогенного гриба, предотвращая развитие комменсальной флоры.

Установлено, что микотоксины фитопатогенных грибов, такие как тенуазоновая кислота (ТК), существенно влияют на реакции иммунитета воштинной огневки и восприимчивость к энтомопатогенным грибам. В частности, ТК приводила к подавлению экспрессии генов, связанных с генерацией АКМ и продукцией АМП в кишечнике и/или жировом теле огневки. Кроме того, под действием ТК наблюдалась общая задержка развития личинок и повышение КОЕ условно-патогенных бактерий в кишечнике. Интересно, что гены противогрибных пептидов в ответ на ТК демонстрировали усиление экспрессии. Этот факт указывает на то, что ТК, действуя как стрессор, может вызывать антигрибную иммунную реакцию, но этой реакции оказывается недостаточно, чтобы предотвратить развитие микоза. Одними из причин повышения восприимчивости к грибу здесь являются задержка развития личинок и пролиферация симбиотических бактерий в кишечнике. Таким образом, ТК, не будучи смертельной, вызывает серьезные нарушения в питании и работе кишечного иммунитета, повышая восприимчивость к грибным патогенам.

Исследование на системе *C. militaris* – *G. mellonella* показало, что температура является важным фактором, определяющим исход развития инфекции. При температуре 15 °С, в структуре смертности преобладал микоз, тогда как при 25 °С – бактериоз, что соотносится с разным уровнем экспрессии генов антигрибных и антибактериальных пептидов. Этот феномен объясняется различной конкурентоспособностью гриба и бактерий в зависимости от температуры и проясняет ряд аспектов экологии гриба *C. militaris*. Данный представитель является более слабым антагонистом бактерий по сравнению с *Beauveria* и *Metarhizium* поскольку адаптирован поражать насекомых в период гибернации. Для таких насекомых характерен обедненный микробиом в связи с опорожнением кишечника перед уходом на зимовку. Кроме того, *C. militaris* адаптирован к развитию в холодных условиях (Kryukov et al., 2018a), что позволяет избегать высокой конкуренции с бактериальными ассоциантами насекомых.

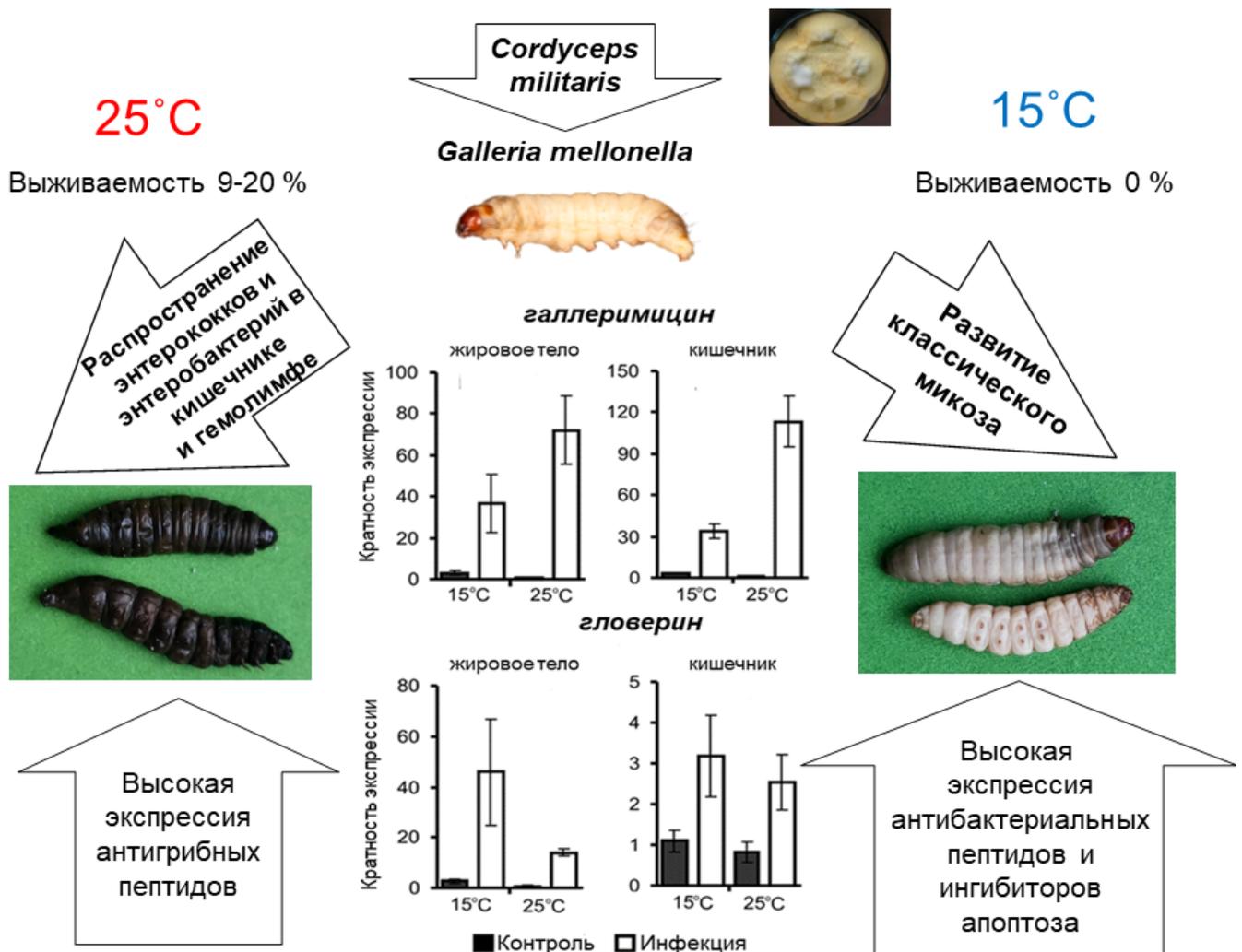


Рисунок 15. Обобщенная схема влияния температур на патогенез, вызванный *C. militaris* у личинок *G. mellonella*.

Таким образом, 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 приводит к генерализированным бактериозам и невозможности развития микопатогена. Умеренные дозы конидий гриба приводят к более сильной активации антибактериальных систем хозяина, что обеспечивает успешное завершение жизненного цикла гриба.

2. Личинки вощинной 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 вощинной 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 вощинной 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 ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Баландин, С. В. Антимикробные пептиды беспозвоночных. Часть 1. Строение, биосинтез и эволюция (Обзорная статья) / С. В. Баландин, Т. В. Овчинникова //Биоорганическая химия. – 2016. – Т. 42. – №. 3. – С. 255-255.

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. – С. 352-427.

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

Крюков, В. Ю. Перспективы использования энтомопатогенных гифомицетов (*Deuteromycota*, *Hyphomycetes*) против колорадского жука в условиях Юго-Восточного Казахстана / В. Ю. Крюков, В. В. Серебров, А. А. Малярчук, Б. К. Копжасаров, Н. С. Мухамедиев, А. К. Орынбаева, В. П. Ходырев //Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2007. – №. 4. – С. 52-60.

Приставко, В. П. Изменение микрофлоры и рН гемолимфы личинок колорадского жука под влиянием белой мушкетеры *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. и ДДТ / В.П. Приставко // Защита растений: республиканский межведомственный тематический научный сборник / ред. В.П. Приставко. – Киев: Урожай, 1967. – С. 47–59.

Abbot, P. Defense in social insects: Diversity, division of labor, and evolution / P. Abbot //Annual Review of Entomology. – 2022. – V. 67. – №. 1. – P. 407-436.

Akhanaev, Y. B. Combined action of the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* and avermectins on the larvae of the colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera, Chrysomelidae) / Y. B. Akhanaev, O. G. Tomilova, O. N. Yaroslavtseva, B. A. Duisembekov, V. Y. Kryukov, V. V. Glupov //Entomological Review. – 2017. – V. 97. – №. 2. – P. 158-165.

Ali, S. Toxicological and biochemical basis of synergism between the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and the insecticide matrine against *Bemisia tabaci* (Gennadius) / S. Ali, C. Zhang, Z. Wang, X. M. Wang, J. H. Wu, A. G. Cuthbertson, B. L. Qiu //Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 46558.

Allonsius, C. N. The microbiome of the invertebrate model host *Galleria mellonella* is dominated by *Enterococcus* / C. N. Allonsius, W. Van Beeck, I. De Boeck, S. Wittouck, S. Lebeer //Animal Microbiome. – 2019. – V. 1. – №. 1. – P. 7.

Altincicek, B. Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum* / B. Altincicek, E. Knorr, A. Vilcinskas //Developmental & Comparative Immunology. – 2008. – V. 32. – №. 5. – P. 585-595.

Alurappa, R. Characterisation and bioactivity of oosporein produced by endophytic fungus *Cochliobolus kusanoi* isolated from *Nerium oleander* L / R. Alurappa, M. R. M. Bojegowda, V. Kumar, N. K. Mallesh, S. Chowdappa //Natural product research. – 2014. – V. 28. – №. 23. – P. 2217-2220.

Alyokhin, A. Insect Pests of Potato: ecology of a potato field / A. Alyokhin, V. Kryukov – Academic Press, 2022. – P. 451-462.

Alyokhin, A. Insect pests of potato: global perspectives on biology and management / A. Alyokhin, S. I. Rondon, Y. Gao (ed.) – Academic Press, 2022.

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.

Araújo, J. P. M. Diversity of entomopathogenic fungi: which groups conquered the insect body? / J. P. M. Araújo, D. P. Hughes //Advances in genetics. – 2016. – V. 94. – P. 1-39.

Asgari, S. Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions / S. Asgari, D. B. Rivers //Annual review of entomology. – 2011. – V. 56. – №. 1. – P. 313-335.

Aynalem, B. Biocontrol competence of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Bacillus thuringiensis* against tomato leaf miner, *Tuta absoluta* Meyrick 1917 under greenhouse and field conditions / B. Aynalem, D. Muleta, M. Jida, F. Shemekite, F. Aseffa, //Heliyon. – 2022. – V. 8. – №. 6.

Bai, J. Gut bacterial microbiota of *Lymantria dispar* asiatica and its involvement in *Beauveria bassiana* infection / J. Bai, Z. Xu, L. Li, Y. Zhang, J. Diao, J. Cao, L. Ma //Journal of Invertebrate Pathology. – 2023. – V. 197. – P. 107897.

Bai, S. Regulatory mechanisms of microbial homeostasis in insect gut / S. Bai, Z. Yao, M. F. Raza, Z. Cai, H. Zhang //Insect Science. – 2021. – V. 28. – №. 2. – P. 286-301.

Baker, R. P. The role of melanin in fungal disease / R. P. Baker, A. Casadevall, E. Camacho, R. J. Cordero, A. Waghmode, L. Liporagi-Lopes, D. F. Smith, //Melanins: Functions, biotechnological production, and applications. – Cham: Springer International Publishing, 2023. – P. 27-43.

Banfi, D. The role of heat shock proteins in insect stress response, immunity, and climate adaptation / D. Banfi, T. Bianchi, M. Mastore, M. F. Brivio //Insects. – 2025. – V. 16. – №. 7. – P. 741.

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

Becchimanzi, A. Venomics of the ectoparasitoid wasp *Bracon nigricans* / A. Becchimanzi, M. Avolio, H. Bostan, C. Colantuono, F. Cozzolino, D. Mancini, F. Pennacchio //BMC genomics. – 2020. – V. 21. – №. 1. – P. 34.

Belhadj Slimen, I. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review / I. Belhadj Slimen, T. Najjar, A. Ghram, H. Dabbebi, M. Ben Mrad, M. Abdrabbah //International journal of hyperthermia. – 2014. – V. 30. – №. 7. – P. 513-523.

Bidochka, M. J. Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences / M. J. Bidochka,

F. V. Menzies, A. M. Kamp //Archives of Microbiology. – 2002. – V. 178. – №. 6. – P. 531-537.

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. Martin, R. R. Farrar Jr //Biological Control. – 2008. – V. 46. – №. 3. – P. 434-441.

Boucias, D. G. Microbiota in insect fungal pathology / D. G. Boucias, Y. Zhou, S. Huang, N. O. Keyhani //Applied microbiology and biotechnology. – 2018. – V. 102. – №. 14. – P. 5873-5888.

Brandt, A. Immunosuppression in honeybee queens by the neonicotinoids thiacloprid and clothianidin / A. Brandt, K. Grikscheit, R. Siede, R. Grosse, M. D. Meixner, R. Büchler //Scientific reports. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 4673.

Brey, P. T. Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells / P. T. Brey, W. J. Lee, M. Yamakawa, Y. Koizumi, S. Perrot, M. Francois, M. Ashida //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1993. – V. 90. – №. 13. – P. 6275-6279.

Broderick, N. A. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity / N. A. Broderick, K. F. Raffa, J. Handelsman // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – V. 103. – №. 41. – P. 15196-15199.

Bruner-Montero, G. Symbiont-mediated protection of *Acromyrmex* leaf-cutter ants from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* / G. Bruner-Montero, M. Wood, H. A. Horn, E. Gemperline, L. Li, C. R. Currie //MBio. – 2021. – V. 12. – №. 6. – P. e01885-21.

Buchon, N. *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation / N. Buchon, N. A. Broderick, M. Poidevin, S. Pradervand, B. Lemaitre //Cell host & microbe. – 2009. – V. 5. – №. 2. – P. 200-211.

Buchon, N. Immunity in *Drosophila melanogaster*—from microbial recognition to whole-organism physiology / N. Buchon, N. Silverman, S. Cherry //Nature reviews immunology. – 2014. – V. 14. – №. 12. – P. 796-810.

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.

Carrasco, L. Differences in eukaryotic ribosomes detected by the selective action of an antibiotic / L. Carrasco, D. Vazquez //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis. – 1973. – V. 319. – №. 2. – P. 209-215.

Carrizo, A. E. *Bacillus thuringiensis*-based bioproduct: characterization and performance against *Spodoptera frugiperda* strains in maize under different environmental temperatures / A. E. Carrizo, F. del Valle Loto, M. D. Baigori, L. M. Pera //Neotropical Entomology. – 2023. – V. 52. – №. 2. – P. 283-291.

Cartagena, E. Activity of a novel compound produced by *Aspergillus parasiticus* in the presence of red flour beetle *Tribolium castaneum* against *Pseudomonas aeruginosa* and coleopteran insects / E. Cartagena, K. Marcinkevicius, C. Luciardi, G. Rodríguez, A. Bardón, M. E. Arena //Journal of Pest Science. – 2014. – V. 87. – №. 3. – P. 521-530.

Chaitanya, R. K. Oxidative stress in invertebrate systems / R. K. Chaitanya, K. Shashank, P. Sridevi //Free Radicals and Diseases. – 2016. – V. 19. – P. 51-68.

Checa, J. Reactive oxygen species: drivers of physiological and pathological processes / J. Checa, J. M. Aran //Journal of Inflammation research. – 2020. – P. 1057-1073.

Chen, K. Immune responses to bacterial and fungal infections in the silkworm, *Bombyx mori* / K. Chen, Z. Lu //Developmental & Comparative Immunology. – 2018. – V. 83. – P. 3-11.

Chen, K. Transcription analysis of the stress and immune response genes to temperature stress in *Ostrinia furnacalis* / K. Chen, T. Tang, Q. Song, Z. Wang, K. He, X. Liu, C. Feng //Frontiers in Physiology. – 2019. – V. 10. – P. 1289.

Cheng, W. Cloning of heat shock protein genes (hsp70, hsc70 and hsp90) and their expression in response to larval diapause and thermal stress in the wheat blossom

midge, *Sitodiplosis mosellana* / W. Cheng, D. Li, Y. Wang, Y. Liu, K. Zhu-Salzman //Journal of insect physiology. – 2016. – V. 95. – P. 66-77.

Chertkova, E. Links between soil bacteriobiomes 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.

Chmiel, J. A. Deleterious effects of neonicotinoid pesticides on *Drosophila melanogaster* immune pathways / J. A. Chmiel, B. A. Daisley, J. P. Burton, G. Reid //MBio. – 2019. – V. 10. – №. 5. – P. 10.1128/mbio.01395-19.

Cirimotich, C. M. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium infection* in *Anopheles gambiae* / C. M. Cirimotich, Y. Dong, A. M. Clayton, S. L. Sandiford, J. A. Souza-Neto, M. Mulenga, G. Dimopoulos //Science. – 2011. – V. 332. – №. 6031. – P. 855-858.

Condé, R. Heat shock causes lower *Plasmodium* infection rates in *Anopheles albimanus* / R. Condé, E. Hernandez-Torres, F. Claudio-Piedras, B. Recio-Tótoro, K. Maya-Maldonado, V. Cardoso-Jaime, H. Lanz-Mendoza //Frontiers in Immunology. – 2021. – V. 12. – P. 584660.

Constanza Mannino, M. Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi / M. C. Mannino, C. Huarte-Bonnet, B. Davyt-Colo, N. Pedrini //Journal of Fungi. – 2019. – V. 5. – №. 2.

Crudo, F. In vitro interactions of *Alternaria* mycotoxins, an emerging class of food contaminants, with the gut microbiota: a bidirectional relationship / F. Crudo, G. Aichinger, J. Mihajlovic, E. Varga, L. Dellafiora, B. Warth, D. Marko //Archives of Toxicology. – 2021. – V. 95. – №. 7. – P. 2533-2549.

Curtis, A. *Galleria mellonella* larvae as a model for investigating fungal—host interactions / A. Curtis, U. Binder, K. Kavanagh //Frontiers in fungal biology. – 2022. – V. 3. – P. 893494.

Cymborowski, B. Temperature-dependent regulatory mechanism of larval development of the wax moth (*Galleria mellonella*) / B. Cymborowski //Acta biochimica polonica. – 2000. – V. 47. – №. 1. – P. 215-221.

Dar, M. A. Termite microbial symbiosis as a model for innovative design of lignocellulosic future biorefinery: current paradigms and future perspectives / M. A. Dar, R. Xie, H. M. Zabed, S. Ali, D. Zhu, J. Sun //Biomass. – 2024. – V. 4. – №. 1. – P. 180-201.

Den Hollander, D. Cytotoxic effects of alternariol, alternariol monomethyl-ether, and tenuazonic acid and their relevant combined mixtures on human enterocytes and hepatocytes / D. Den Hollander, C. Holvoet, K. Demeyere, N. De Zutter, K. Audenaert, E. Meyer, S. Croubels // Frontiers in Microbiology. – 2022. – V. 13. – P. 849243.

Deng, J. Associated bacteria of a pine sawyer beetle confer resistance to entomopathogenic fungi via fungal growth inhibition / J. Deng, W. Xu, G. Lv, H. Yuan, Q. H. Zhang, J. D. Wickham, L. Zhang //Environmental Microbiome. – 2022. – V. 17. – №. 1. – P. 47.

Diaz-Albiter, H. Reactive oxygen species-mediated immunity against *Leishmania mexicana* and *Serratia marcescens* in the phlebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis* / H. Diaz-Albiter, M. R. Sant'Anna, F. A. Genta, R. J. Dillon //Journal of Biological Chemistry. – 2012. – V. 287. – №. 28. – P. 23995-24003.

Dillon, R. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota / R. Dillon, K. Charnley //Research in microbiology. – 2002. – V. 153. – №. 8. – P. 503-509.

Dolezal, T. How to eliminate pathogen without killing oneself? Immunometabolism of encapsulation and melanization in *Drosophila* / T. Dolezal //Frontiers in Immunology. – 2023. – V. 14. – P. 1330312.

Dong, Y. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti* / Y. Dong, J. C. Morton Jr, J. L. Ramirez, J. A. Souza-Neto, G. Dimopoulos //Insect biochemistry and molecular biology. – 2012. – V. 42. – №. 2. – P. 126-132.

Dubovskiy, I. M. Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi? / I. M. Dubovskiy, M. M. Whitten, O. N. Yaroslavtseva, C. Greig, V. Y. Kryukov, E. V. Grizanova, T. M. Butt //PloS one. – 2013a. – V. 8. – №. 4. – P. e60248.

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, T. Butt //Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2013b. – V. 280. – №. 1763. – P. 20130584.

Dubovskiy, I. M. Encapsulation and nodulation in insects / I.M. Dubovskiy, N.A. Kryukova, V.V. Glupov, N. A. Ratcliffe //Invertebrate Survival Journal. – 2016. – V. 13. – №. 1. – P. 229-246.

Eleftherianos, I. Haemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites / I. Eleftherianos, C. Heryanto, T. Bassal, W. Zhang, G. Tettamanti, A. Mohamed //Immunology. – 2021. – V. 164. – №. 3. – P. 401-432.

El-Saadi, M. I. Cold-induced immune activation in chill-susceptible insects / M. I. El-Saadi, H. A. MacMillan, L. V. Ferguson //Current Opinion in Insect Science. – 2023. – V. 58. – P. 101054.

Emery, H. The diarrhetic shellfish-poisoning toxin, okadaic acid, provokes gastropathy, dysbiosis and susceptibility to bacterial infection in a non-rodent bioassay, *Galleria mellonella* / H. Emery, W. Traves, A. F. Rowley, C. J. Coates //Archives of Toxicology. – 2021. – V. 95. – №. 10. – P. 3361-3376.

Engl, T. Ancient symbiosis confers desiccation resistance to stored grain pest beetles / T. Engl, N. Eberl, C. Gorse, T. Krüger, T. H. Schmidt, R. Plarre, M. Kaltenpoth //Molecular ecology. – 2018. – V. 27. – №. 8. – P. 2095-2108.

Fan, Y. Regulatory cascade and biological activity of *Beauveria bassiana* oosporein that limits bacterial growth after host death / Y. Fan, X. Liu, N. O. Keyhani, G. Tang, Y. Pei, W. Zhang, S. Tong //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – V. 114. – №. 9. – P. E1578-E1586.

Farahani, S. Differential expression of heat shock proteins and antioxidant enzymes in response to temperature, starvation, and parasitism in the *Carob moth* larvae, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) / S. Farahani, A. R. Bandani, H. Alizadeh, S. H. Goldansaz, S. Whyard, //PloS one. – 2020. – V. 15. – №. 1. – P. e0228104.

Ferguson, L. V. Seasonal shifts in the insect gut microbiome are concurrent with changes in cold tolerance and immunity / L. V. Ferguson, P. Dhakal, J. E. Lebenzon, D. E. Heinrichs, C. Bucking, B. J. Sinclair //Functional ecology. – 2018. – V. 32. – №. 10. – P. 2357-2368.

Feyereisen, R. Origin and evolution of the CYP4G subfamily in insects, cytochrome P450 enzymes involved in cuticular hydrocarbon synthesis / R. Feyereisen //Molecular phylogenetics and evolution. – 2020. – V. 143. – P. 106695.

Fisher, J. J. Starvation and imidacloprid exposure influence immune response by *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) to a fungal pathogen / J. J. Fisher, L. A. Castrillo, B. G. Donzelli, A. E. Hajek //Journal of Economic Entomology. – 2017. – V. 110. – №. 4. – P. 1451-1459.

Foster, S. P. How insect exocrine glands work / S. P. Foster, J. Casas //Annual Review of Entomology. – 2025. – V. 70. – №. 1. – P. 65-82.

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 //Journal of Invertebrate Pathology. – 2003. – V. 83. – №. 2. – P. 127-138.

Gaidyshev, I. P. Solving scientific and engineering problems by means of Excel. VBA. and C++. / BKhV-Peterburg. – 2004.

García-Robles, I. Proteomic insights into the immune response of the Colorado potato beetle larvae challenged with *Bacillus thuringiensis* / I. García-Robles, J. De Loma, M. Capilla, I. Roger, P. Boix-Montesinos, P. Carrión, C. Rausell //Developmental & Comparative Immunology. – 2020. – V. 104. – P. 103525.

Geng, T. JAK/STAT signaling pathway-mediated immune response in silkworm (*Bombyx mori*) challenged by *Beauveria bassiana* / T. Geng, D. D. Lv, Y. X. Huang, C. X. Hou, G. X. Qin, X. J. Guo //Gene. – 2016. – V. 595. – №. 1. – P. 69-76.

Giammarino, A. *Galleria mellonella* as a Model for the Study of Fungal Pathogens: Advantages and Disadvantages / A. Giammarino, N. Bellucci, L. Angiolella //Pathogens. – 2024. – V. 13. – №. 3. – P. 233.

Gichuhi, J. Influence of inoculated gut bacteria on the development of *Bactrocera dorsalis* and on its susceptibility to the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* / J. Gichuhi, F. Khamis, J. Van den Berg, S. Mohamed, S. Ekesi, J. K. Herren //BMC microbiology. – 2020. – V. 20. – №. 1. – P. 321.

Goettler, W. Comparative morphology of the symbiont cultivation glands in the antennae of female digger wasps of the genus *Philanthus* (hymenoptera: Crabronidae) / W. Goettler, M. Kaltenpoth, S. McDonald, E. Strohm // Frontiers in Physiology. – 2022. – V. 13. – P. 815494.

Gołębiowski, M. Identification and antifungal activity of novel organic compounds found in cuticular and internal lipids of medically important flies / M. Gołębiowski, M. Cerkowniak, A. Urbanek, M. Dawgul, W. Kamysz, M. I. Boguś, P. Stepnowski // Microbiological Research. – 2015. – V. 170. – P. 213-222.

González-Tokman, D. Antioxidants, oxidative stress and reactive oxygen species in insects exposed to heat / D. González-Tokman, S. Villada-Bedoya, A. Hernández, B. Montoya // Current Research in Insect Science. – 2025. – P. 100114.

Govaere, L. Transcriptome and proteome analyses to investigate the molecular underpinnings of cold response in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* / L. Govaere, M. D. Morin, J. J. Frigault, S. Boquel, A. Cohen, S. G. Lamarre, P. J. Morin //Cryobiology. – 2019. – V. 88. – P. 54-63.

Gretscher, R. R. A common theme in extracellular fluids of beetles: extracellular superoxide dismutases crucial for balancing ROS in response to microbial challenge / R. R. Gretscher, P. E. Streicher, A. S. Strauß, N. Wielsch, M. Stock, D. Wang, A. Burse //Scientific Reports. – 2016. – V. 6. – №. 1. – P. 24082.

Griesch, J. Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the haemolymph of *Galleria mellonella*: a new pathway mediating induction of humoral immune responses / J. Griesch, M. Wedde, A. Vilcinskis //Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2000. – V. 30. – №. 6. – P. 461-472.

Grizanova, E. V. RNAi-mediated suppression of insect metalloprotease inhibitor (IMPI) enhances *Galleria mellonella* susceptibility to fungal infection / E. V. Grizanova, C. J. Coates, T. M. Butt, I. M. Dubovskiy //Developmental & Comparative Immunology. – 2021. – V. 122. – P. 104126.

Gu, J. Hsp70 and small Hsps are the major heat shock protein members involved in midgut metamorphosis in the common cutworm, *Spodoptera litura* / J. Gu, L. X. Huang, Y. Shen, L. H. Huang, Q. L. Feng //Insect Molecular Biology. – 2012. – V. 21. – №. 5. – P. 535-543.

Guz, N. Molecular characterization and expression patterns of heat shock proteins in *Spodoptera littoralis*, heat shock or immune response? / N. Guz, A. Dageri, B. Altincicek, S. Aksoy //Cell Stress and Chaperones. – 2021. – V. 26. – №. 1. – P. 29-40.

Hammer, Ø. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis / Ø. Hammer, D. A. T. Harper //Paleontology electronica. – 2001. – V. 4. – №. 1. – P. 1.

Han, P. Destruxin A inhibits scavenger receptor B mediated melanization in *Aphis citricola* / P. Han, Q. Gong, J. Fan, M. Abbas, D. Chen, J. Zhang //Pest Management Science. – 2022. – V. 78. – №. 5. – P. 1915-1924.

Hegedus, D. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function / D. Hegedus, M. Erlandson, C. Gillott, U. Toprak //Annual review of entomology. – 2009. – V. 54. – №. 1. – P. 285-302.

Hoffmann, A. A. Changes in the frequency of facultative endosymbionts in insect populations: overview and applications / A. A. Hoffmann, B. S. Cooper //Entomologia generalis. – 2025. – V. 45. – №. 2. – P. 351.

Hong, S. Microbiome assembly on *Drosophila* body surfaces benefits the flies to combat fungal infections / S. Hong, Y. Sun, D. Sun, C. Wang // *Science*. – 2022. – V. 25. – №. 6.

Hong, S. Fungal infection of insects: molecular insights and prospects / S. Hong, J. Shang, Y. Sun, G. Tang, C. Wang // *Trends in Microbiology*. – 2024. – V. 32. – №. 3. – P. 302-316.

Horak, R. D. Symbionts shape host innate immunity in honeybees / R. D. Horak, S. P. Leonard, N. A. Moran // *Proceedings of the Royal Society B*. – 2020. – V. 287. – №. 1933. – P. 20201184.

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, C. Wang // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – V. 111. – №. 47. – P. 16796-16801.

Huang, A. A M35 family metalloprotease is required for fungal virulence against insects by inactivating host prophenoloxidasases and beyond / A. Huang, M. Lu, E. Ling, P. Li, C. Wang // *Virulence*. – 2020. – V. 11. – №. 1. – P. 222-237.

Ishii, K. Activation of the silkworm cytokine by bacterial and fungal cell wall components via a reactive oxygen species-triggered mechanism / K. Ishii, H. Hamamoto, M. Kamimura, K. Sekimizu // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – V. 283. – №. 4. – P. 2185-2191.

Islam, W. Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests / W. Islam, M. Adnan, A. Shabbir, H. Naveed, Y. S. Abubakar, M. Qasim, H. Ali // *Microbial Pathogenesis*. – 2021. – V. 159. – P. 105122.

James, R. R. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity / R. R. James, J. Xu // *Journal of invertebrate pathology*. – 2012. – V. 109. – №. 2. – P. 175-182.

Jang, H. A. Current status of immune deficiency pathway in *Tenebrio molitor* innate immunity / H. A. Jang, M. A. M. Kojour, B. B. Patnaik, Y. S. Han, Y. H. Jo //Frontiers in Immunology. – 2022. – V. 13. – P. 906192.

Janke, R. S. Bacterial ectosymbionts in cuticular organs chemically protect a beetle during molting stages / R. S. Janke, F. Kaftan, S. P. Niehs, K. Scherlach, A. Rodrigues, A. Svatoš, L. V. Flórez //The ISME Journal. – 2022a. – V. 16. – №. 12. – P. 2691-2701.

Janke, R. S. Morphological adaptation for ectosymbiont maintenance and transmission during metamorphosis in *Lagria* beetles / R. S. Janke, S. Moog, B. Weiss, M. Kaltenpoth, L. V. Flórez //Frontiers in Physiology. – 2022b. – V. 13. – P. 979200.

Jaronski, S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens / S. T. Jaronski //BioControl. – 2010. – V. 55. – №. 1. – P. 159-185.

Júnior, N. G. O. Antimicrobial peptides: structure, functions and translational applications / N. G. O. Júnior, C. M. Souza, D. F. Buccini, M. H. Cardoso, O. L. Franco //Nature reviews. Microbiology. – 2025.

Kaczmarek, A. The multifunctional role of IFN- $\gamma$  in *Galleria mellonella* (Lepidoptera) immunocompetent cells / A. Kaczmarek, A. K. Wrońska, J. Sobich, M. I. Boguś //Cytokine. – 2025. – V. 185. – P. 156804.

Kaltenpoth, M. Origin and function of beneficial bacterial symbioses in insects / M. Kaltenpoth, L. V. Flórez, A. Vigneron, P. Dirksen, T. Engl //Nature Reviews Microbiology. – 2025. – P. 1-17.

Kang, W. N. A switch of microbial flora coupled with ontogenetic niche shift in *Leptinotarsa decemlineata* / W. N. Kang, L. Jin, K. Y. Fu, W. C. Guo, G. Q. Li //Archives of Insect Biochemistry and Physiology. – 2021. – V. 107. – №. 1. – P. e21782.

Kanyile, S. N. Endosymbiosis allows *Sitophilus oryzae* to persist in dry conditions / S. N. Kanyile, T. Engl, A. Heddi, M. Kaltenpoth //Frontiers in Microbiology. – 2023. – V. 14. – P. 1199370.

Kanyile, S. N. Nutritional symbionts enhance structural defence against predation and fungal infection in a grain pest beetle / S. N. Kanyile, T. Engl, M. Kaltenpoth //Journal of Experimental Biology. – 2022. – V. 225. – №. 1. – P. jeb243593.

Katsuma, S. A. *Wolbachia* factor for male killing in lepidopteran insects / S. Katsuma, K. Hirota, N. Matsuda-Imai, T. Fukui, T. Muro, K. Nishino, T. Kiuchi //Nature communications. – 2022. – V. 13. – №. 1. – P. 6764.

Kaur, H. P. Studies on immunomodulatory effect of endophytic fungus *Alternaria alternata* on *Spodoptera litura* / H. P. Kaur, B. Singh, A. Thakur, A. Kaur, S. Kaur //Journal of Asia-Pacific Entomology. – 2015. – V. 18. – №. 1. – P. 67-75.

Kazek, M. Diet influences the bacterial and free fatty acid profiles of the cuticle of *Galleria mellonella* larvae / M. Kazek, A. Kaczmarek, A.K. Wrońska, M.I. Boguś //PLoS One. – 2019. – V. 14. – №. 2. – P. e0211697.

Kepler, R. M. A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (Hypocreales) / R. M. Kepler, J. J. Luangsa-Ard, N. L. Hywel-Jones, C. A. Quandt, G. H. Sung, S. A. Rehner, B. Shrestha //IMA fungus. – 2017. – V. 8. – №. 2. – P. 335-353.

Keyhani, N. O. Lipid biology in fungal stress and virulence: Entomopathogenic fungi / N. O. Keyhani //Fungal biology. – 2018. – V. 122. – №. 6. – P. 420-429.

Kikuchi, Y. Collapse of insect gut symbiosis under simulated climate change / Y. Kikuchi, A. Tada, D. L. Musolin, N. Hari, T. Hosokawa, K. Fujisaki, T. Fukatsu //MBio. – 2016. – V. 7. – №. 5. – P. 10.1128/mbio.01578-16.

Kim, S. H. Role of DUOX in gut inflammation: lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions / S. H. Kim, W. J. Lee //Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2014. – V. 3. – P. 116.

King, A. M. Insect heat shock proteins during stress and diapause / A. M. King T. H. MacRae //Annual review of entomology. – 2015. – V. 60. – №. 1. – P. 59-75.

Kocab, A. J. Inhibitor of apoptosis proteins as intracellular signaling intermediates / A. J. Kocab, C. S. Duckett //The FEBS journal. – 2016. – V. 283. – №. 2. – P. 221-231.

Koller, J. Entomopathogens and parasitoids allied in biocontrol: A systematic review / J. Koller, L. Sutter, J. Gonthier, J. Collatz, L. Norgrove //Pathogens. – 2023. – V. 12. – №. 7. – P. 957.

Kordaczuk, J. Chemosensory protein 16 has an immune function and participates in host-pathogen interaction in *Galleria mellonella* infected with *Pseudomonas entomophila* / J. Kordaczuk, M. Sułek, P. Mak, A. Frączek, I. Wojda //Virulence. – 2025. – V. 16. – №. 1. – P. 2471367.

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. Local epizootics caused by teleomorphic cordycipitoid fungi (Ascomycota: Hypocreales) in populations of forest lepidopterans and sawflies of the summer-autumn complex in Siberia / V. Y. Kryukov, O. N. Yaroslavtseva, G. R. Lednev, B. A. Borisov //Microbiology. – 2011. – V. 80. – №. 2. – P. 286-295.

Kryukov, V. Y. Stromata cultivation of entomopathogenic fungus *Cordyceps militaris* (Hypocreales) on nonspecific hosts / V. Y. Kryukov, O. N. Yaroslavtseva, A. E. Kukharenko, V. V. Glupov. – 2012.

Kryukov, V. Y. Susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to anamorphic entomopathogenic ascomycetes under envenomation and parasitization by *Habrobracon hebetor* / V. Y. Kryukov, N. A. Kryukova, V. V. Glupov //Russian Journal of Ecology. – 2013. – V. 44. – №. 1. – P. 89.

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

Kryukov, V. Y. Immunosuppression of insects by the venom of *Habrobracon hebetor* increases the sensitivity of bait method for the isolation of entomopathogenic fungi from soils / V. Y. Kryukov, M. V. Tyurin, O. G. Tomilova, O. N. Yaroslavtseva, N. A. Kryukova, B. A. Duisembekov, V. V. Glupov //Biology bulletin. – 2017. – V. 44. – №. 4. – P. 401-405.

Kryukov, V. Y. Temperature adaptations of *Cordyceps militaris*, impact of host thermal biology and immunity on mycosis development / V. Y. Kryukov, O. G. Tomilova, O. N. Yaroslavtseva, T. C. Wen, N. A. Kryukova, O. V. Polenogova, V. V. Glupov //Fungal Ecology. – 2018a. – V. 35. – P. 98-107.

Kryukov, V. Y. 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, V. V. Glupov //Pest Management Science. – 2018b. – V. 74. – №. 3. – P. 598-606.

Kryukov, V. Y. Fungal infection dynamics in response to temperature in the lepidopteran insect *Galleria mellonella* / V. Y. Kryukov, O. N. Yaroslavtseva, M. M. Whitten, M. V. Tyurin, K. J. Ficken, C. Greig, T. M. Butt //Insect science. – 2018c. – V. 25. – №. 3. – P. 454-466.

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

Kryukov, V. Y. Bacterial decomposition of insects post-*Metarhizium* infection: Possible influence on plant growth / V. Y. Kryukov, M. R. Kabilov, N. Smirnova, O. G. Tomilova, M. V. Tyurin, Y. B. Akhanaev, V. V. Glupov //Fungal Biology. – 2019. – V. 123. – №. 12. – P. 927-935.

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.

Kryukov, V. Y. Physiological and Ecological Aspects of Interactions between Entomopathogenic Fungi (Ascomycota, Hypocreales) and Insects/ V. Y. Kryukov, O. N. Yaroslavtseva, V. V. Glupov //Entomological Review. – 2021a. – V. 101. – №. 8. – P. 1096-1112.

Kryukov, V. Y. Fungus *Metarhizium robertsii* and neurotoxic insecticide affect gut immunity and microbiota in Colorado potato beetles / V. Y. Kryukov, U. Rotskaya, O. Yaroslavtseva, O. Polenogova, N. Kryukova, Y. Akhanaev, V. V. Glupov //Scientific reports. – 2021b. – V. 11. – №. 1. – P. 1299.

Kryukov, V. Y. Parasitoid venom alters the lipid composition and development of microorganisms on the wax moth cuticle / V. Y. Kryukov, E. I. Chernyak, N. Kryukova, M. Tyurin, A. Krivopalov, O. Yaroslavtseva, S. V. Morozov //Entomologia Experimentalis et Applicata. – 2022. – V. 170. – №. 10. – P. 852-868.

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.

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.

Kryukova, N. A. *Galleria mellonella* larvae fat body disruption (Lepidoptera: Pyralidae) caused by the venom of *Habrobracon brevicornis* (Hymenoptera: Braconidae) / N. A. Kryukova, K. A. Mozhaytseva, U. N. Rotskaya, V. V. Glupov //Archives of Insect Biochemistry and Physiology. – 2021. – V. 106. – №. 1. – P. e21746.

Kumar, A. Sequencing, de novo assembly and annotation of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, transcriptome / A. Kumar, L. Congiu, L. Lindström, S. Piironen, M. Vidotto, A. Grapputo //PLoS One. – 2014. – V. 9. – №. 1. – P. e86012.

Lange, A. *Galleria mellonella*: a novel invertebrate model to distinguish intestinal symbionts from pathobionts / A. Lange, A. Schäfer, A. Bender, A. Steimle, S. Beier, R. Parusel, J. S. Frick //Frontiers in immunology. – 2018. – V. 9. – P. 2114.

Lebenzon, J. E. Diapause differentially modulates the transcriptomes of fat body and flight muscle in the Colorado potato beetle / J. E. Lebenzon, A. S. Torson, B. J. Sinclair //Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics. – 2021. – V. 40. – P. 100906.

Leulier, F. The *Drosophila* inhibitor of apoptosis protein DIAP2 functions in innate immunity and is essential to resist gram-negative bacterial infection / F. Leulier, N. Lhocine, B. Lemaitre, P. Meier //Molecular and cellular biology. – 2006. – V. 26. – №. 21. – P. 7821-7831.

Li, Z. W. The small heat shock protein (sHSP) genes in the silkworm, *Bombyx mori*, and comparative analysis with other insect sHSP genes / Z. W. Li, X. Li, Q. Y. Yu, Z. H. Xiang, H. Kishino, Z. Zhang //BMC Evolutionary Biology. – 2009. – V. 9. – №. 1. – P. 215.

Li, X. Heat stress affects the expression of antimicrobial peptide genes in adult honeybee (*Apis cerana* and *Apis mellifera*) / X. Li, W. Ma, Y. Jiang //International Journal of Tropical Insect Science. – 2022. – V. 42. – №. 3. – P. 2465-2471.

Li, J. Induced expression modes of genes related to Toll, Imd, and JAK/STAT signaling pathway-mediated immune response in *Spodoptera frugiperda* infected with *Beauveria bassiana* / J. Li, Y. Mao, J. Yi, M. Lin, H. Xu, Y. Cheng, J. Liu //Frontiers in Physiology. – 2023. – V. 14. – P. 1249662.

Liang, C. Identification and expression analysis of heat shock protein family genes of gall fly (*Procecidochares utilis*) under temperature stress / C. Liang, L. Li, H. Zhao, M. Lan, Y. Tang, M. Zhang, X. Gao //Cell Stress and Chaperones. – 2023. – V. 28. – №. 3. – P. 303-320.

Lionakis, M. S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology / M. S. Lionakis //Virulence. – 2011. – V. 2. – №. 6. – P. 521-527.

Liu, H. Mosquito gut microbiota: A review / H. Liu, J. Yin, X. Huang, C. Zang, Y. Zhang, J. Cao, M. Gong //Pathogens. – 2024. – V. 13. – №. 8. – P. 691.

Lu, H. L. Insect immunity to entomopathogenic fungi / H. L. Lu, R. J. S. Leger //Advances in genetics. – 2016. – V. 94. – P. 251-285.

Lu, Z. Multifunctional role of a fungal pathogen-secreted laccase 2 in evasion of insect immune defense / Z. Lu, J. Deng, H. Wang, X. Zhao, Z. Luo, C. Yu, Y. Zhang //Environmental Microbiology. – 2021. – V. 23. – №. 2. – P. 1256-1274.

Luan, J. B. Insect bacteriocytes: Adaptation, development, and evolution / J. B. Luan //Annual Review of Entomology. – 2024. – V. 69. – №. 1. – P. 81-98.

Łukasik, P. Protection against a fungal pathogen conferred by the aphid facultative endosymbionts *Rickettsia* and *Spiroplasma* is expressed in multiple host genotypes and species and is not influenced by co-infection with another symbiont / P. Łukasik, H. Guo, M. Van Asch, J. Ferrari, H. C. J. Godfray //Journal of Evolutionary Biology. – 2013. – V. 26. – №. 12. – P. 2654-2661.

Łukasik, P. With a little help from my friends: the roles of microbial symbionts in insect populations and communities / P. Łukasik, M. R. Kolasa //Philosophical Transactions of the Royal Society B. – 2024. – V. 379. – №. 1904. – P. 20230122.

Ma, M. A life-and-death struggle: interaction of insects with entomopathogenic fungi across various infection stages / M. Ma, J. Luo, C. Li, I. Eleftherianos, W. Zhang, L. Xu //Frontiers in immunology. – 2024. – V. 14. – P. 1329843.

Ma, X. *Beauveria bassiana* ribotoxin (BbRib) induces silkworm cell apoptosis via activating ros stress response / X. Ma, Q. Ge, R. H. Taha, K. Chen, Y. Yuan //Processes. – 2021. – V. 9. – №. 8. – P. 1470.

Maingi, F. M. Immunological responses and gut microbial shifts in *Phthorimaea absoluta* exposed to *Metarhizium anisopliae* isolates under different temperature

regimes / F. M. Maingi, K. S. Akutse, I. J. Ajene, K. M. Omolo, F. M. Khamis //Frontiers in Microbiology. – 2023. – V. 14. – P. 1258662.

Malassigné, S. Diversity and functions of yeast communities associated with insects / S. Malassigné, G. Minard, L. Vallon, E. Martin, C. Valiente Moro, P. Luis //Microorganisms. – 2021. – V. 9. – №. 8. – P. 1552.

Mallick, S. Role of cuticular genes in the insect antimicrobial immune response / S. Mallick, I. Eleftherianos //Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2024. – V. 14. – P. 1456075.

Marena, G. D. *Galleria mellonella* as an invertebrate model for studying fungal infections / G. D. Marena, L. Thomaz, J. D. Nosanchuk, C. P. Taborda //Journal of Fungi. – 2025. – V. 11. – №. 2. – P. 157.

Marieshwari, B. N. Insect phenoloxidase and its diverse roles: melanogenesis and beyond / B. N. Marieshwari, S. Bhuvanaragavan, K. Sruthi, P. Mullainadhan, S. Janarthanan, //Journal of Comparative Physiology B. – 2023. – V. 193. – №. 1. – P. 1-23.

Martinson, E. O. *Nasonia vitripennis* venom causes targeted gene expression changes in its fly host / E. O. Martinson, D. Wheeler, J. Wright, Mrinalini, A. L. Siebert, J. H. Werren //Molecular ecology. – 2014. – V. 23. – №. 23. – P. 5918-5930.

Mc Namara, L. Oosporein, an abundant metabolite in *Beauveria caledonica*, with a feedback induction mechanism and a role in insect virulence / L. Mc Namara, S. K. Dolan, J. M. Walsh, J. C. Stephens, T. R. Glare, K. Kavanagh, C. T. Griffin //Fungal biology. – 2019. – V. 123. – №. 8. – P. 601-610.

McCutcheon, J. P. The life of an insect endosymbiont from the cradle to the grave / J. P. McCutcheon, B. M. Boyd, C. Dale //Current Biology. – 2019. – V. 29. – №. 11. – P. R485-R495.

McMullen, E. JAK/STAT mediated insulin resistance in muscles is essential for effective immune response / E. McMullen, L. Strych, L. Chodakova, A. Krebs, T. Dolezal //Cell Communication and Signaling. – 2024. – V. 22. – №. 1. – P. 203.

Melo, N. R. Myriocin significantly increases the mortality of a non-mammalian model host during *Candida* pathogenesis / N. R. D. Melo, A. Abdrahman, C. Greig, K. Mukherjee, C. Thornton, N. A. Ratcliffe, T. M. Butt // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – №. 11. – P. e78905.

Miguel-Aliaga, I. Anatomy and physiology of the digestive tract of *Drosophila melanogaster* / I. Miguel-Aliaga, H. Jasper, B. Lemaitre // *Genetics*. – 2018. – V. 210. – №. 2. – P. 357-396.

Mikonranta, L. Insect immunity: oral exposure to a bacterial pathogen elicits free radical response and protects from a recurring infection / L. Mikonranta, J. Mappes, M. Kaukoniitty, D. Freitak // *Frontiers in zoology*. – 2014. – V. 11. – №. 1. – P. 23.

Miller, D. L. A bacterial symbiont protects honey bees from fungal disease / D. L. Miller, E. A. Smith, I. L. G. Newton // *MBio*. – 2021. – V. 12. – №. 3. – P. 10.1128/mbio.00503-21.

Moghadam, Z. M. From flies to men: ROS and the NADPH oxidase in phagocytes / Z. M. Moghadam, P. Henneke, J. Kolter // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2021. – V. 9. – P. 628991.

Mondal, S. Insect microbial symbionts: Ecology, interactions, and biological significance / S. Mondal, J. Somani, S. Roy, A. Babu, A. K. Pandey // *Microorganisms*. – 2023. – V. 11. – №. 11. – P. 2665.

Morin-Poulard, I. The *Drosophila* JAK-STAT pathway in blood cell formation and immunity / I. Morin-Poulard, A. Vincent, M. Crozatier // *Jak-Stat*. – 2013. – V. 2. – №. 3. – P. e25700.

Motta, E. V. S. Glyphosate induces immune dysregulation in honey bees / E. V. S. Motta, J. E. Powell, N. A. Moran // *Animal Microbiome*. – 2022. – V. 4. – №. 1. – P. 16.

Moutaoufik, M. T. Analysis of insect nuclear small heat shock proteins and interacting proteins / M. T. Moutaoufik, R. M. Tanguay // *Cell Stress and Chaperones*. – 2021. – V. 26. – №. 1. – P. 265-274.

Mowlds, P. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans* / P. Mowlds, K. Kavanagh //Mycopathologia. – 2008. – V. 165. – №. 1. – P. 5-12.

Werren, J. H. Parasitoid wasps and their venoms / J. H. Werren //Evolution of venomous animals and their toxins. – Springer, Dordrecht, 2016. – P. 1-26.

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

Muratoglu, H. The first investigation of the diversity of bacteria associated with *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) / H. Muratoglu, Z. Demirbag, K. Sezen //Biologia. – 2011. – V. 66. – №. 2. – P. 288-293.

Naumova, N. Root and rhizosphere microbiome of tomato plants grown in the open field in the south of West Siberia under mineral fertilization / N. Naumova, O. Baturina, T. Nechaeva, M. Kabilov //Horticulturae. – 2022. – V. 8. – №. 11. – P. 1051.

Neizvestny, D. S. Comparison of Molecular Genetic Mechanisms of Response to Heat and Cold Stresses in *Drosophila melanogaster* / D. S. Neizvestny, E. Y. Yakovleva //Biology Bulletin Reviews. – 2024. – V. 14. – №. 5. – P. 548-560.

Nishi, O. Phylogenetic classification and physiological and ecological traits of *Metarhizium* spp / O. Nishi //Mycoscience. – 2024. – V. 65. – №. 5. – P. 235-243.

Noskov, Y. A. A neurotoxic insecticide promotes fungal infection in *Aedes aegypti* larvae by altering the bacterial community/ Y. A. Noskov, M. R. Kabilov, O. V. Polenogova, Y. A. Yurchenko, O. E. Belevich, O. N. Yaroslavtseva, V. Y. Kryukov //Microbial ecology. – 2021. – V. 81. – №. 2. – P. 493-505.

O'Neill, S. L Scaled deployment of *Wolbachia* to protect the community from dengue and other *Aedes* transmitted arboviruses / S. L. O'Neill, P. A. Ryan, A. P. Turley, G. Wilson, K. Retzki, I. Iturbe-Ormaetxe, C. P. Simmons //Gates open research. – 2019. – V. 2. – P. 36.

Ortiz-Urquiza, A. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle / A. Ortiz-Urquiza, N.O. Keyhani //Insects. – 2013. – V. 4. – №. 3. – P. 357-374.

Pedrini, N. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi / N. Pedrini, R. Crespo, M. P. Juárez //Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. – 2007. – V. 146. – №. 1-2. – P. 124-137.

Pedrini, N. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction / N. Pedrini, A. Ortiz-Urquiza, C. Huarte-Bonnet, S. Zhang, N.O. Keyhani //Frontiers in microbiology. – 2013. – V. 4. – P. 24.

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 Biology. – 2018. – V. 122. – №. 6. – P. 538-545.

Perlmutter, J. I. *Wolbachia* enhances the survival of *Drosophila* infected with fungal pathogens / J.I. Perlmutter, A. Atadurdyeva, M.E. Schedl, R.L. Unckless //BMC biology. – 2025. – V. 23. – №. 1. – P. 42.

Petersen, L. M. Influence of temperature on the physiology and virulence of the insect pathogen *Serratia* sp. strain SCBI / L. M. Petersen, L. S. Tisa //Applied and environmental microbiology. – 2012. – V. 78. – №. 24. – P. 8840-8844.

Polenogova, O. V. Parasitoid envenomation alters the *Galleria mellonella* midgut microbiota and immunity, thereby promoting fungal infection/ O. V. Polenogova, M. R. Kabilov, M. V. Tyurin, U. N. Rotskaya, A. V. Krivopalov, V. V. Morozova, V. V. Glupov //Scientific Reports. – 2019. – V. 9. – №. 1. – P. 4012.

Prakash, A. Duox and Jak/Stat signalling influence disease tolerance in *Drosophila* during *Pseudomonas entomophila* infection / A. Prakash, K. Monteith, M. Bonnet, P. Vale //Developmental & Comparative Immunology. – 2023. – V. 147. – P. 104756.

Preisler, H. K. Estimation of treatment efficacy when numbers of test subjects are unknown / H. K. Preisler, J. L. Robertson //Journal of economic entomology. – 1992. – V. 85. – №. 4. – P. 1033-1040.

Qian, C. Lethal, transmission, behavioral, and physiological effects of *Metarhizium anisopliae* against gregarious larvae of *Heortia vitessoides* and synergistic effects

between *Metarhizium anisopliae* and insecticides / C. Qian, T. Ma, H. Qiu, H. Lyu, S. Liang, Y. Shao, P. Yuan, L. Shen, X. Wen, C. Wang //Pest Management Science. – 2023. – V. 79. – №. 6. – P. 2191-2205.

Ramirez, J. L. Strain-specific pathogenicity and subversion of phenoloxidase activity in the mosquito *Aedes aegypti* by members of the fungal entomopathogenic genus *Isaria* / J.L. Ramirez, E.J. Muturi, C. Dunlap, A.P. Rooney //Scientific Reports. – 2018. – V. 8. – №. 1. – P. 9896.

Ramond, E. Reactive oxygen species-dependent innate immune mechanisms control methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* virulence in the *Drosophila* larval model / E. Ramond, A. Jamet, X. Ding, D. Euphrasie, C. Bouvier, L. Lallemand, A. Charbit //MBio. – 2021. – V. 12. – №. 3. – P. 10.1128/mbio.00276-21.

Řeřicha, M. Changes in haemolymph parameters and insect ability to respond to immune challenge during overwintering / Řeřicha M., Dobeš P., Knapp M. //Ecology and Evolution. – 2021. – V. 11. – №. 9. – P. 4267-4275.

Robertson, J. L. Pesticide bioassays with arthropods. / J. L. Robertson, H. K. Preisler – CRC Press, 1992.

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.

Russell, S. L. *Wolbachia* endosymbionts manipulate the self-renewal and differentiation of germline stem cells to reinforce fertility of their fruit fly host / S. L. Russell, J. R. Castillo, W. T. Sullivan //PLoS Biology. – 2023. – V. 21. – №. 10. – P. e3002335.

Sajjadian, S. M. Dual oxidase-derived reactive oxygen species against *Bacillus thuringiensis* and its suppression by eicosanoid biosynthesis inhibitors / S.M. Sajjadian, Y. Kim //Frontiers in Microbiology. – 2020. – V. 11. – P. 528.

Salehipour-Shirazi, G. Does cold activate the *Drosophila melanogaster* immune system? / G. Salehipour-Shirazi, L. V. Ferguson, B. J. Sinclair //Journal of insect physiology. – 2017. – V. 96. – P. 29-34.

Salimova, D. Entomotoxic activity of the extracts from the fungus, *Alternaria tenuissima* and its major metabolite, tenuazonic acid / D. Salimova, A. Dalinova, V. Dubovik, I. Senderskiy, E. Stepanycheva, O. Tomilova, Q. Hu, A. Berestetskiy //Journal of Fungi. – 2021. – V. 7. – №. 9. – P. 774.

Sarvari, M. The innate immune gene Relish and Caudal jointly contribute to the gut immune homeostasis by regulating antimicrobial peptides in *Galleria mellonella* / M. Sarvari, A. Mikani, M. Mehrabadi //Developmental & Comparative Immunology. – 2020. – V. 110. – P. 103732.

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

Scheirer, C. J. The analysis of ranked data derived from completely randomized factorial designs / C. J. Scheirer, W. S. Ray, N. Hare // Biometrics. – 1976. – P. 429-434.

Schoville, S. D. A model species for agricultural pest genomics: the genome of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) / S.D. Schoville, Y.H. Chen, M.N. Andersson, J.B. Benoit, A. Bhandari, J.H. Bowsher, K. Brevik, S. Richards //Scientific reports. – 2018. – V. 8. – №. 1. – P. 1931.

Shamjana, U. The role of insect gut microbiota in host fitness, detoxification and nutrient supplementation / U. Shamjana, D.A. Vasu, P.S. Hembrom, K. Nayak, T. Grace //Antonie Van Leeuwenhoek. – 2024. – V. 117. – №. 1. – P. 71.

Sheehan, G. Characterization of the cellular and proteomic response of *Galleria mellonella* larvae to the development of invasive aspergillosis / G. Sheehan, G. Clarke, K. Kavanagh //BMC microbiology. – 2018. – V. 18. – №. 1. – P. 63.

Sheehan, G. Proteomic profiling of bacterial and fungal induced immune priming in *Galleria mellonella* larvae / G. Sheehan, A. Margalit, D. Sheehan, K. Kavanagh // *Journal of Insect Physiology*. – 2021. – V. 131. – P. 104213.

Shelby, K. S. Parasitism-linked block of host plasma melanization / K.S. Shelby, O.A. Adeyeye, B.M. Okot-Kotber, B.A. Webb // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2000. – V. 75. – №. 3. – P. 218-225.

Shi, J. Tenuazonic acid-triggered cell death is the essential prerequisite for *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler to infect successfully host *Ageratina adenophora* / J. Shi, M. Zhang, L. Gao, Q. Yang, H.M. Kalaji, S. Qiang, R.J. Strasser, S. Chen // *Cells*. – 2021. – V. 10. – №. 5. – P. 1010.

Shi, X. Q. Validation of reference genes for expression analysis by quantitative real-time PCR in *Leptinotarsa decemlineata* (Say) / X.Q. Shi, W.C. Guo, P.J. Wan, L.T. Zhou, X.L. Ren, T. Ahmat, K.Y. Fu, G.Q. Li // *BMC research notes*. – 2013. – V. 6. – №. 1. – P. 93.

Shim, J. K. Upregulation of heat shock protein genes by envenomation of ectoparasitoid *Bracon hebetor* in larval host of Indian meal moth *Plodia interpunctella* / J.K. Shim, D.M. Ha, S.K. Nho, K.S. Song, K.Y. Lee // *Journal of invertebrate pathology*. – 2008. – V. 97. – №. 3. – P. 306-309.

Shrestha, B. The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development / B. Shrestha, W. Zhang, Y. Zhang, X. Liu // *Mycological progress*. – 2012. – V. 11. – №. 3. – P. 599-614.

Sinclair, B. J. Cross-tolerance and cross-talk in the cold: relating low temperatures to desiccation and immune stress in insects / B.J. Sinclair, L.V. Ferguson, G. Salehipour-Shirazi, H.A. MacMillan // *Integrative and comparative biology*. – 2013. – V. 53. – №. 4. – P. 545-556.

Singh, S. Molecular rationale of insect-microbes symbiosis—from insect behaviour to Mechanism / S. Singh, A. Singh, V. Baweja, A. Roy, A. Chakraborty, I. K. Singh // *Microorganisms*. – 2021. – V. 9. – №. 12. – P. 2422.

Sivakumar, G. Characterization and role of gut bacterium *Bacillus pumilus* on nutrition and defense of leafhopper (*Amrasca biguttula biguttula*) of cotton / G. Sivakumar, R. Rangeswaran, M.S. Yandigeri, M. Mohan, T. Venkatesan, C.R. Ballal, A. Verghese //Indian Journal of Agricultural Sciences. – 2017. – V. 87. – №. 4. – P. 534-9.

Smith, D. F. Q. Glyphosate inhibits melanization and increases susceptibility to infection in insects / D.F.Q. Smith, E. Camacho, R. Thakur, A.J. Barron, Y. Dong, G. Dimopoulos, N.A. Broderick, A. Casadevall //PLoS biology. – 2021. – V. 19. – №. 5. – P. e3001182.

Smith, D. F. Q. *Galleria mellonella* immune melanization is fungicidal during infection / D.F.Q. Smith, Q. Dragotakes, M. Kulkarni, J.M. Hardwick, A. Casadevall //Communications biology. – 2022. – V. 5. – №. 1. – P. 1364.

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. Gula //Journal of Invertebrate Pathology. – 1982. – V. 39. – №. 1. – P. 15-22.

Srinivasan, S. R. Heat shock protein 70 (Hsp70) suppresses RIP1-dependent apoptotic and necroptotic cascades / S.R. Srinivasan, L.C. Cesa, X. Li, O. Julien, M. Zhuang, H. Shao, J. Chung, I. Maillard, J.A. Wells, J. E. Gestwicki //Molecular cancer research. – 2018. – V. 16. – №. 1. – P. 58-68.

Srygley, R. B. Increasing temperature reduces cuticular melanism and immunity to fungal infection in a migratory insect / R. B. Srygley, S. T. Jaronski //Ecological Entomology. – 2022. – V. 47. – №. 1. – P. 109-113.

Stara, J. Does *Leptinotarsa decemlineata* larval survival after pesticide treatment depend on microbiome composition? / J. Stara, J. Hubert //Pest Management Science. – 2023. – V. 79. – №. 12. – P. 4921-4930.

Stevens, E. J. Host microbiota can facilitate pathogen infection / E. J. Stevens, K. A. Bates, K. C. King //PLoS pathogens. – 2021. – V. 17. – №. 5. – P. e1009514.

Sun, Y. Production of helvolic acid in *Metarhizium* contributes to fungal infection of insects by bacteriostatic inhibition of the host cuticular microbiomes / Y. Sun, S.

Hong, H. Chen, Y. Yin, C. Wang //Microbiology Spectrum. – 2022. – V. 10. – №. 5. – P. e02620-22.

Takov, D. Coleopterans as model organisms in insect immunity: a review / D. Takov, P. Ostoich, M. Zubrik, D. Pilarska //North-western journal of zoology. – 2022. – V. 18. – №. 1.

Tang, G. Fungal evasion of *Drosophila* immunity involves blocking the cathepsin-mediated cleavage maturation of the danger-sensing protease / G. Tang, S. Song, J. Shang, Y. Luo, S. Li, D. Wei, C. Wang //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2025. – V. 122. – №. 3. – P. e2419343122.

Tkaczuk, C. Temperature requirements for the colony growth and conidial germination of selected isolates of entomopathogenic fungi of the *Cordyceps* and *Paecilomyces* genera / C. Tkaczuk, A. Majchrowska-Safaryan //Agriculture. – 2023. – V. 13. – №. 10. – P. 1989.

Toledo, A. V. Growth inhibition of *Beauveria bassiana* by bacteria isolated from the cuticular surface of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* and the planthopper, *Delphacodes kuscheli*, two important vectors of maize pathogens / A.V. Toledo, A.M. Alippi, A.M.M. de Remes Lenicov //Journal of Insect Science. – 2011. – V. 11. – №. 1. – P. 29.

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.Y. Kryukov, B.A. Duisembekov, O.N. Yaroslavtseva, M.V. Tyurin, N.A. Kryukova, V. V. Glupov //Journal of Invertebrate Pathology. – 2016. – V. 140. – P. 8-15.

Tomilova, O. G. Changes in antifungal defence systems during the intermoult period in the Colorado potato beetle / O. G. Tomilova, O. N. Yaroslavtseva, M. D. Ganina, M. V. Tyurin, E. I. Chernyak, I. V. Senderskiy, S. V. Morozov //Journal of insect physiology. – 2019. – V. 116. – P. 106-117.

Towarnicki, S. G. Yin and Yang of mitochondrial ROS in *Drosophila* / S.G. Towarnicki, L.M. Kok, J.W.O. Ballard //Journal of Insect Physiology. – 2020. – V. 122. – P. 104022.

Van Herreweghe, J. M. Invertebrate lysozymes: diversity and distribution, molecular mechanism and in vivo function / J.M. Van Herreweghe, C.W. Michiels //Journal of biosciences. – 2012. – V. 37. – №. 2. – P. 327-348.

Van Moll, L. Microbial symbionts of insects as a source of new antimicrobials: a review / L. Van Moll, J. De Smet, P. Cos, L. Van Campenhout //Critical Reviews in Microbiology. – 2021. – V. 47. – №. 5. – P. 562-579.

Vasilikos, L. Regulating the balance between necroptosis, apoptosis and inflammation by inhibitors of apoptosis proteins / L. Vasilikos, L.M. Spilgies, J. Knop, W.W.L. Wong //Immunology and cell biology. – 2017. – V. 95. – №. 2. – P. 160-165.

Vega, F. E. Fungal entomopathogens / F.E. Vega, N.V. Meyling, J.J. Luangsa-ard, M. Blackwell //Insect pathology. – 2012. – V. 2. – P. 171-220.

Vertyporokh, L. Expression of the insect metalloproteinase inhibitor IMPI in the fat body of *Galleria mellonella* exposed to infection with *Beauveria bassiana* / L. Vertyporokh, I. Wojda //Acta Biochimica Polonica. – 2017. – V. 64. – №. 2. – P. 273-278.

Vesović, N. Pygidial glands of the blue ground beetle *Carabus intricatus*: chemical composition of the secretion and its antimicrobial activity / N. Vesović, M. Nenadić, M. Soković, A. Ćirić, L. Vujisić, M. Todosijević, N. Stevanović, S. Ćurčić //The Science of Nature. – 2022. – V. 109. – №. 2. – P. 19.

Vey, A. Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during ecdysis / A. Vey, J. Fargues //Journal of Invertebrate Pathology. – 1977. – V. 30. – №. 2. – P. 207-215.

Vivekanandhan, P. Toxicity of *Metarhizium flavoviride* conidia virulence against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and its impact on physiological and biochemical activities / P. Vivekanandhan, K. Swathy, L. Alford, S. Pittarate, S.P.R.R.

Subala, S. Mekchay, D. Elangovan, P. Krutmuang //Scientific Reports. – 2022. – V. 12. – №. 1. – P. 16775.

Vivekanandhan, P. Effects of *Beauveria bassiana* on *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) and Its Impact on Catalase and Glutathione S-transferase Enzymes / P. Vivekanandhan, M. Q. Waheeb //Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2025. – P. 103654.

Vogel, H. A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella* / H. Vogel, B. Altincicek, G. Glöckner, A. Vilcinskas //BMC genomics. – 2011. – V. 12. – №. 1. – P. 308.

Vorontsova, Y. L. The effect of inactivated bacteria on the redox status of larvae of the wax moth *Galleria mellonella* / Y.L. Vorontsova, I.A. Slepneva, N.A. Kryukova, T.N. Klementeva, S. Zhangissina, A.N. Esaulko, V. V. Glupov //Physiological Entomology. – 2025.

Wang, H. S. cDNA cloning of heat shock proteins and their expression in the two phases of the migratory locust / H.S. Wang, X.H. Wang, C.S. Zhou, L.H. Huang, S.F. Zhang, W. Guo, L. Kang //Insect Molecular Biology. – 2007. – V. 16. – №. 2. – P. 207-219.

Wang, B. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species / W.B. Wang Bing, K.Q.J. Kang QianJin, L.Y.Z. Lu YuZhen, B.L.Q. Bai LinQuan, W. C. Wang ChengShu //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – V. 109. – №. 4. – P. 1287-1292.

Wang, C. Insect pathogenic fungi: genomics, molecular interactions, and genetic improvements / C. Wang, S. Wang //Annual review of entomology. – 2017. – V. 62. – №. 1. – P. 73-90.

Wang, Q. Peptidoglycan recognition proteins in insect immunity / Q. Wang, M. Ren, X. Liu, H. Xia, K. Chen //Molecular immunology. – 2019. – V. 106. – P. 69-76.

Wang, J. Geographically isolated Colorado potato beetle mediating distinct defense responses in potato is associated with the alteration of gut microbiota / J. Wang, Z. Gao,

M. Yang, R. Xue, H. Yan, K. Fu, Z. Zhang, W. Guo, G.W. Felton, R. Zeng //Journal of Pest Science. – 2020a. – V. 93. – №. 1. – P. 379-390.

Wang, R. J. Reactive oxygen species and antimicrobial peptides are sequentially produced in silkworm midgut in response to bacterial infection / R.J. Wang, K. Chen, L.S. Xing, Z. Lin, Z. Zou, Z. Lu //Developmental & Comparative Immunology. – 2020b. – V. 110. – P. 103720.

Wang, H. The toxins of *Beauveria bassiana* and the strategies to improve their virulence to insects / H. Wang, H. Peng, W. Li, P. Cheng, M. Gong //Frontiers in microbiology. – 2021. – V. 12. – P. 705343.

Wang, Z. Topical fungal infection induces shifts in the gut microbiota structure of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) / Z. Wang, Y. Cheng, Y. Wang, X. Yu //Insects. – 2022. – V. 13. – №. 6. – P. 528.

Wang, G. J. Identification and analysis of C-type lectins from *Helicoverpa armigera* in response to the entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi* infection / G. J. Wang, J. L. Wang, X. S. Liu //Developmental & Comparative Immunology. – 2023a. – V. 140. – P. 104620.

Wang, J. L. An entomopathogenic fungus exploits its host humoral antibacterial immunity to minimize bacterial competition in the hemolymph / J. L. Wang, J. Sun, Y. J. Song, H. H. Zheng, G. J. Wang, W. X. Luo, X. S. Liu // Microbiome. – 2023b. – V. 11. – №. 1. – P. 116.

Warmbold, C. Dermatophagoides pteronyssinus major allergen 1 activates the innate immune response of the fruit fly *Drosophila melanogaster* / C. Warmbold, K. Uliczka, F. Rus, R. Suck, A. Petersen, N. Silverman, T. Roeder //The Journal of Immunology. – 2013. – V. 190. – №. 1. – P. 366-371.

Weber, D. C. Biological and behavioral control of potato insect pests / D. C. Weber, M. B. Blackburn, S. T. Jaronski //Insect pests of potato. – 2022. – P. 231-276.

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 //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 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. – V. 9. – №. 6. – P. e98784.

Wilberts, L. Use of endophytic entomopathogenic fungi to improve biological control of pest insects. L. Wilberts, B. Lievens, H. Jacquemyn. – 2023.

Wilhelm, L. Gene expression atlas of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) / L. Wilhelm, Y. Wang, S. Xu //Scientific Data. – 2025. – V. 12. – №. 1. – P. 299.

Wojda, I. Heat shock affects host–pathogen interaction in *Galleria mellonella* infected with *Bacillus thuringiensis* / I. Wojda, P. Taszłow //Journal of insect physiology. – 2013. – V. 59. – №. 9. – P. 894-905.

Wojda, I. Temperature stress and insect immunity / I. Wojda //Journal of Thermal Biology. – 2017a. – V. 68. – P. 96-103.

Wojda, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella* / I. Wojda //Insect science. – 2017b. – V. 24. – №. 3. – 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 //Journal of Invertebrate Pathology. – 2005. – V. 90. – №. 3. – P. 139-150.

Wraight, S. P. Characterization of the synergistic interaction between *Beauveria bassiana* strain GHA and *Bacillus thuringiensis morrisoni* strain tenebrionis applied against Colorado potato beetle larvae / S. P. Wraight, M. E. Ramos //Journal of Invertebrate Pathology. – 2017a. – V. 144. – P. 47-57.

Wraight, S. P. Effects of inoculation method on efficacy of wettable powder and oil dispersion formulations of *Beauveria bassiana* against Colorado potato beetle larvae under low-humidity conditions / S. P. Wraight, M. E. Ramos //Biocontrol science and technology. – 2017b. – V. 27. – №. 3. – P. 348-363.

Wrońska, A. K. Cuticular fatty acids of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) inhibit fungal enzymatic activities of pathogenic *Conidiobolus coronatus* / A.K. Wrońska, M.I.

Boguś, E. Włóka, M. Kazek, A. Kaczmarek, K. Zalewska //PLoS One. – 2018. – V. 13. – №. 3. – P. e0192715.

Wrońska, A. K. Heat shock proteins (HSP 90, 70, 60, and 27) in *Galleria mellonella* (Lepidoptera) hemolymph are affected by infection with *Conidiobolus coronatus* (Entomophthorales) / A.K. Wrońska, M.I. Boguś //PLoS One. – 2020. – V. 15. – №. 2. – P. e0228556.

Wu, S. Expression of antimicrobial peptide genes in *Bombyx mori* gut modulated by oral bacterial infection and development / S. Wu, X. Zhang, Y. He, J. Shuai, X. Chen, E. Ling //Developmental & Comparative Immunology. – 2010. – V. 34. – №. 11. – P. 1191-1198.

Xiao, B. Heat Shock Factor regulation of antimicrobial peptides expression suggests a conserved defense mechanism induced by febrile temperature in arthropods / B. Xiao, S. Chen, Y. Wang, X. Liao, J. He, C. Li //bioRxiv. – 2024. – P. 2024.08.02.606295.

Xiao, X. A Mesh–Duox pathway regulates homeostasis in the insect gut / X. Xiao, L. Yang, X. Pang, R. Zhang, Y. Zhu, P. Wang, G. Gao, G. A. Cheng //Nature microbiology. – 2017. – V. 2. – №. 5. – P. 1-12.

Xu, L. Gut microbiota in an invasive bark beetle infected by a pathogenic fungus accelerates beetle mortality / L. Xu, J. Deng, F. Zhou, C. Cheng, L. Zhang, J. Zhang, M. Lu //Journal of Pest Science. – 2019. – V. 92. – №. 1. – P. 343-351.

Yan, J. Chromosome-level genome assembly of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* / J. Yan, C. Zhang, M. Zhang, H. Zhou, Z. Zuo, X. Ding, R. Zhang, F. Li, Y. Gao //Scientific Data. – 2023. – V. 10. – №. 1. – P. 36.

Yang, L. The pupal ectoparasitoid *Pachycrepoideus vindemmiae* regulates cellular and humoral immunity of host *Drosophila melanogaster* / L. Yang, B. Wan, B. B. Wang, M. M. Liu, Q. Fang, Q. S. Song, G. Y. Ye //Frontiers in Physiology. – 2019. – V. 10. – P. 1282.

Yang, H. Tissue communication in a systemic immune response of *Drosophila* / H. Yang, D. Hultmark //Fly. – 2016. – V. 10. – №. 3. – P. 115-122.

Yao, Z. The dual oxidase gene *BdDuox* regulates the intestinal bacterial community homeostasis of *Bactrocera dorsalis* / Z. Yao, A. Wang, Y. Li, Z. Cai, B. Lemaitre, H. Zhang //The ISME journal. – 2016. – V. 10. – №. 5. – P. 1037-1050.

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.Y. Kryukov, V.V. Glupov //Journal of Insect Physiology. – 2017. – V. 96. – P. 14-20.

Yassine, H. The mosquito melanization response is implicated in defense against the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* / H. Yassine, L. Kamareddine, M. A. Osta //PLoS pathogens. – 2012. – V. 8. – №. 11. – P. e1003029.

Yu, Y. *Drosophila* symbionts in infection: when a friend becomes an enemy / Y. Yu, I. Iatsenko //Infection and Immunity. – 2025. – V. 93. – №. 5. – P. e00511-24.

Zeng, T. The intestinal immune defense system in insects / T. Zeng, S. Jaffar, Y. Xu, Y. Qi //International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – V. 23. – №. 23. – P. 15132.

Zhang, D. Parasitism by entomopathogenic fungi and insect host defense strategies / D. Zhang, H. Qi, F. Zhang //Microorganisms. – 2025. – V. 13. – №. 2. – P. 283.

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 management science. – 2018. – V. 74. – №. 2. – P. 438-447.

Zhang, W. Inhibitor of apoptosis-1 gene as a potential target for pest control and its involvement in immune regulation during fungal infection / W. Zhang, N. O. Keyhani, H. Zhang, K. Cai, Y. Xia //Pest Management Science. – 2020. – V. 76. – №. 5. – P. 1831-1840.

Zhang, X. Diversity and functional roles of the gut microbiota in Lepidopteran insects / X. Zhang, F. Zhang, X. Lu //Microorganisms. – 2022. – V. 10. – №. 6. – P. 1234.

Zhang, Y. Enhanced capacity of a leaf beetle to combat dual stress from entomopathogens and herbicides mediated by associated microbiota / Y. Zhang, H. Xu, C. Tu, R. Han, J. Luo, L. Xu //Integrative Zoology. – 2024. – V. 19. – №. 6. – P. 1092-1104.

Zhang, L. B. Antioxidant enzymes and their contributions to biological control potential of fungal insect pathogens / L. B. Zhang, M. G. Feng //Applied microbiology and biotechnology. – 2018. – V. 102. – №. 12. – P. 4995-5004.

Zhao, P. From phyllosphere to insect cuticles: silkworms gather antifungal bacteria from mulberry leaves to battle fungal parasite attacks / P. Zhao, S. Hong, Y. Li, H. Chen, H. Gao, C. Wang //Microbiome. – 2024. – V. 12. – №. 1. – P. 40.

Zhou, B. Environmental, genetic and cellular toxicity of tenuazonic acid isolated from *Alternaria alternata* / B. Zhou, S. Qiang //African Journal of Biotechnology. – 2008. – V. 7. – №. 8.

Zhou, F. Bacterial inhibition on *Beauveria bassiana* contributes to microbiota stability in *Delia antiqua* / F. Zhou, Y. Gao, M. Liu, L. Xu, X. Wu, X. Zhao, X. Zhang //Frontiers in Microbiology. – 2021. – V. 12. – P. 710800.

## **ПРИЛОЖЕНИЯ**

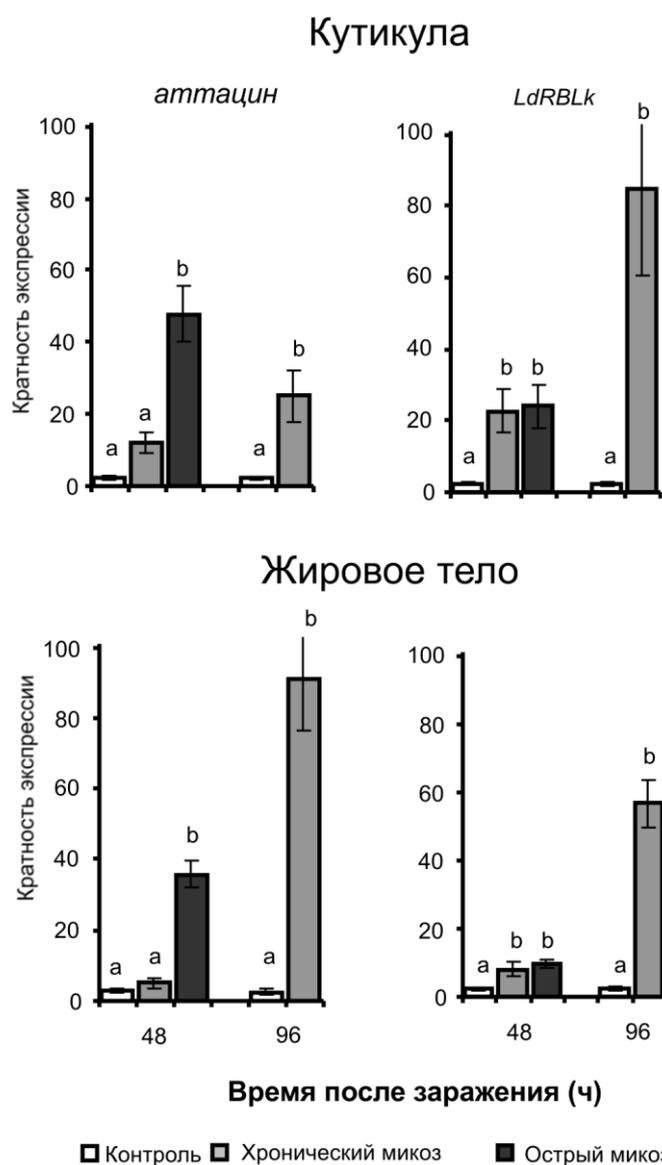


Рисунок 1. Изменения экспрессии генов аттацина и рицинового  $\beta$ -лектина (*LdRBLk*) в кутикуле и жировом теле личинок колорадского жука при развитии длительной и острой инфекций *Beauveria bassiana*. Разные буквы указывают на статистически значимые различия между вариантами в каждой временной точке (тест Данна для 48 ч и тест Манна–Уитни для 96 ч,  $p < 0.05$ )

Таблица 1. Список генов и последовательностей праймеров *Galleria mellonella*, используемых в ПЦР.

Наименование гена	Регистрационный номер в NCBI GenBank	Обозначение гена	Последовательность праймера (5' – 3')	Размер продукта (bp)	Эффективность ПЦР ( $\pm$ SD)	Tm °C	Источник
Translation elongation factor 1-alfa	AF423811.1	<i>EF1a</i>	For CTGAACCTCCTTACAGTGAATCC Rev GCATGTTATCTCCGTGCCAG	135	1.92 $\pm$ 0,06/ 1.97 $\pm$ 0,02/	62/64	Melo et al., (2013)
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB11	XM_026902197.2	<i>RBP11</i>	For CGCCAACCTTTGAATCATTCCTT Rev TGGTGTCTGATCATGTTTCCAAGA	136	1.96 $\pm$ 0,06/ 1.99 $\pm$ 0,04/	62/64	Rotskaya U.N.*
Gallerimycin	AF453824.1	<i>Glm</i>	For GAAGTCTACAGAATCACACGA Rev ATCGAAGACATTGACATCCA	161	1.98 $\pm$ 0,4	62	Melo et al., (2013)
Gloverin	AF394588.1	<i>Glo</i>	For AGATGCACGGTCCTACAG Rev GATCGTAGGTGCCTTGTG	93	1.98 $\pm$ 0,02	62	Melo et al., (2013)
Galiomycin	AY528421.1	<i>Gal</i>	For GTGCGACGAATTACACCTC Rev TACTCGCACCAACAATTGAC	103	1.78 $\pm$ 0,03	62	Melo et al., (2013)
Inducible metalloproteinase inhibitor	AY330624.1	<i>Impi</i>	For TAGTAAGCAGTAGCATAGTCC Rev GCCATCTTCACAGTAGCA	161	1.94 $\pm$ 0,04	62	Melo et al., (2013)
Heat shock protein 70	XM_031909614.1	<i>Hsp70</i>	For CGACGACCCCAAGATACAACAG Rev CGTCTCGCCCTTGAACCTCC	100	1.98 $\pm$ 0,04	64	Rotskaya U.N.*
Heat shock protein 90	AF394591.1	<i>Hsp90</i>	For TCAGCTTCACGGACAGCTTCT Rev GACCCCAGAGCTTGCATTGG	152	1.98 $\pm$ 0,04	62	Rotskaya U.N.
Cecropin-like	XM_026898304.2	<i>Cec</i>	For CTGTTCGTGTTCGCTTGTGT Rev GTGGTAGGCGAAGCAGCTAC	158	1.96 $\pm$ 0,03	64	Rotskaya U.N.*
Lysozym-like	XM_026894466.2	<i>Lys</i>	For GGACTGGTCCGAGCACTTAG Rev CACGGTTGCCTCTAAATGCG	253	1.94 $\pm$ 0,04	64	Lange et al., (2018)
NADPH oxidase 4-like	NW_022272931.1	<i>Nox4</i>	For TGGCACGGCATCAGTTATCA Rev ACAGCGACTGTCATGTGGAA	159	1.95 $\pm$ 0,06	64	Lange et al., (2018)
Inhibitor of apoptosis protein	FJ643490.1	<i>Iap</i>	For ACTTTCAACGATTGGCCGCT Rev TCCCAATCTTTAAGACCGCCG	128	1.98 $\pm$ 0,04	64	Melo et al., (2013)

\* Праймеры были разработаны У.Н. Рощкой при помощи онлайн ресурсов <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, IDT OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Таблица 2. Список генов и последовательностей праймеров *Leptinotarsa decemlineata*, используемых в ПЦР.

Наименование гена	Регистрационный номер в NCBI GenBank	Обозначение гена	Последовательность праймера (5' – 3')	Размер продукта (bp)	Эффективность ПЦР (±SD)	Tm ПЦР, °C	Источник
60S ribosomal protein L4	XM_023165859.1	<i>Rp4</i>	For GAAACGAGCATTGCCCTTCC Rev TCGCTGACACTGTAGGGTTG	119	1.96±0,06	62	Shi X.-Q. et al., (2013)
60S ribosomal protein L18	XM_023172940.1	<i>Rp18</i>	For TAGAATCCTCAAAGCAGGTGGC Rev CTGGACCAAAGTGTT CACTGC	133	1.98±0,02	62	Shi X.-Q. et al., (2013)
ADP-ribosylation factor-like protein 4	KC190027.1	<i>ARF2</i>	For GTGCTCGCGAACCATGTGA Rev AAACCTCCAATCCCTCGTGAAG	140	1.94±0,01	62	Shi X.-Q. et al., (2013)
ADP-ribosylation factor-like protein 1	XM_023169879.1	<i>ARF19</i>	ForCGGTGCTGGTAAAACGACAATATT Rev TGACCTCCCAAATCCCAAACCTT	135	1.98±0,02	62	Shi X.-Q. et al., (2013)
Signal transducer and activator of transcription protein	XM_023165198.1	<i>Stat</i>	For AGGAGCAGAACACAGGGTAC Rev TTTGCCTGGGAATTCTGTTGAC	140	1.94± 0,03	62	Rotskaya U.N. *
Gut membraneassociated protein Mesh	XM_023158552.1	<i>Mesh</i>	For CGCAATGGTTCAACGATATGGT Rev GCTTGGTACGCGACACAGT	124	1.95±0,01	62	Rotskaya U.N. *
DorsalDif-like protein	XM_023158121.1	<i>Dorsal like</i>	For TGTGCGAAAAGGTGGCTAAAG Rev ACTTGGGAGGGTTGGAAGTC	94	1.95±0,05	62	Rotskaya U.N. *
NF-kappaB-like protein	XM_023174540.1	<i>Nf-kb-like</i>	For AAGCAGCGGTTTGATTCGTTC Rev AACTCGTCCAAGTTCTCCAGG	120	1.96±0,06	62	Rotskaya U.N. *
Attacin-B-like	XM_023168834	<i>Att34</i>	For TGAGAACTCCACAAAATATTCCTTCG Rev CTAAGGGTATGGCAGCAACAAC	98	1.78± 0,02	62	Rotskaya U.N. *
Ricin-like β-lectin k	GEEF01084863	<i>LdRLBLk</i>	For GAACTGTTGATTGTCGTCACCATG Rev TGAAAGTTTGGGAGATGGAAC	140	1.84± 0,03	62	Rotskaya U.N. *

\* Праймеры были разработаны У.Н. Роцкой при помощи онлайн ресурсов Primer-BLAST <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, IDT OligoAnalyser Tool, IDT UNAFold Tool <https://eu.idtdna.com>