

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУННОГО ОТВЕТА, КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ И ВОСПРИИМЧИВОСТИ К БАКТЕРИЯМ *BACILLUS THURINGIENSIS* У КОЛОРАДСКОГО ЖУКА *LEPTINOTARSA DECEMLINEATA*

© 2024 г. Д. С. Терещенко¹, Е. В. Гризанова¹, Е. В. Шелихова¹,
Т. Ю. Аликина², М. Р. Кабилов², И. М. Дубовский¹. *

¹Новосибирский государственный аграрный университет, Кафедра защиты растений, Новосибирск, Россия.

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия.

*e-mail: dubovskiy2000@yahoo.com

Поступила в редакцию 11.10.2024 г.

После доработки 13.11.2024 г.

Принята к публикации 18.11.2024 г.

Биологические инсектициды для защиты растений на основе бактерий *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) обладают высокой специфичностью действия по отношению к различным отрядам насекомых и безопасны для окружающей среды. Колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata*) самый распространенный вредитель пасленовых культур в мире. Широкий ареал обитания колорадского жука в различных по климатическим условиям регионах, быстрое формирование устойчивости к широкому спектру химических инсектицидов, ставит вопрос за счет каких защитных реакций он обладает такой экологической пластичностью и насколько быстро формирует устойчивость к биологическим инсектицидам. В данном исследовании у личинок колорадского жука из двух районов Новосибирской области (НСО) изучены показатели клеточного и гуморального иммунитета, активность ферментов антиоксидантной и детоксицирующей систем, микробиота кишечника и восприимчивость к бактериям *B. thuringiensis*. Общее количество гемоцитов и лизоцим-подобная антибактериальная активность в гемолимфе у насекомых Венгеровского района НСО в 1,5–2 раза выше по сравнению с личинками Ордынского района НСО. В кишечнике и жировом теле у личинок из Ордынского района отмечена повышенная в 1.7–2.5 раза активность ферментов детоксикации по сравнению с Венгеровской группой насекомых. Показано, что доминирующей группой кишечной микробиоты насекомых из двух районов НСО являются бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и *Citrobacter*, однако у личинок из Ордынского района одной из мажорных групп являются бактерии рода *Spiroplasma*. Установлено, что насекомые не отличались по уровню чувствительности к бактериям *B. thuringiensis*. Развитие бактериальной инфекции приводит к увеличению активности ФО в гемолимфе насекомых в 2–3 раза, при этом у группы насекомых Ордынского района НСО зарегистрирован 1.5–кратное увеличение общего количества гемоцитов. Таким образом, установлено, что насекомые разных географических популяций могут эффективно перестраивать защитную стратегию от энтомопатогенов, за счет баланса между их конституциональными и индуцированными системами резистентности.

Ключевые слова: резистентность, фенолоксидаза, гемоциты, энтомопатогены, кишечный иммунитет, метабаркодинг, ген 16S рРНК

DOI: 10.31857/S0044452924070079, **EDN:** KJZNRG

ВВЕДЕНИЕ

Колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata*) – один из самых распространенных и опасных вредителей сельскохозяйственных культур семейства пасленовых [1]. Вредоносность данного вида объясняется значительной экологической пластичностью, что позволяет ему адаптироваться к изменениям условий среды обитания [2, 3]. Основной метод контроля численности колорадского жука

заключается в применении химических инсектицидов. Однако на сегодняшний день известно, что колорадский жук способен формировать устойчивость к химическим препаратам практически всех классов [4]. Альтернативой химическим инсектицидам является применение биопрепаратов, созданных на основе энтомопатогенных микроорганизмов, в частности бактерий *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), которые обладают высокой специфичностью

действия по отношению к различным отрядам насекомых и безопасны для окружающей среды. Препараты для защиты растений на основе бактерий *Bt* – самые продаваемые биологические инсектициды в мире на сегодняшний день [5]. Бактерии *Bt* распространены повсеместно в природе, продуцируют широкий спектр инсектицидных белков (Cry, Vip, Cyt и др.), активных против насекомых из различных отрядов [6–8]. Инсектицидное действие бактерий *Bt* осуществляется за счет продуцируемого в виде кристалла дельта-эндотоксина, содержащего Cry и Cyt белки, спор, а также вторичных факторов вирулентности [6, 9]. Ранее был показан синергетический эффект спор и Cry3Aa токсина бактерий *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* var. *thuringiensis* в смертности личинок колорадского жука [10]. Кристаллический эндотоксин бактерий *Bt* растворяется под действием кислотности кишечника насекомых, происходит высвобождение протоксенов Cry и их последующая активация за счет протеолитических ферментов в просвете кишечника насекомых [11, 12]. Далее происходит агрегация активированных Cry-токсенов и связывание с рецепторами на поверхности эпителиальных клеток кишечника, что приводит к разрушению клеток кишечника за счет образования пор или активации внутриклеточных сигнальных путей [13, 14].

Иммунная и детоксицирующая системы насекомых принимают участие в защите колорадского жука от бактериальной инфекции *B. thuringiensis*. Было показано, что сублетальная бактериальная инфекция *B. thuringiensis* вызывает изменения в активности реакций клеточного и гуморального иммунитета колорадского жука [15]. Гемоциты, присутствующие в гемолимфе, обеспечивают фагоцитоз, инкапсуляцию и меланизацию, а также могут вырабатывать антимикробные пептиды (АМП), которые приводят к снижению скорости размножения или уничтожению патогена, главным образом путем лизиса [16]. Процесс меланизации играет центральную роль в защите насекомых от широкого спектра патогенов и включает в себя скоординированное взаимодействие рецепторов распознавания (PRR), сериновых протеаз, ингибиторов сериновых протеаз и фенолоксидаз [14].

Инактивация токсичных метаболитов эндогенного и экзогенного происхождения, в том числе токсинов патогенов, осуществляется комплексом ферментов детоксицирующей системы [17, 18]. Ферменты глутатион-S-трансферазы (ГСТ) и неспецифические эстеразы принимают участие в детоксикации Cry-токсенов бактерий *Bt* у насекомых [19]. Было показано их участие в защите колорадского жука от токсинов, образующихся при бактериальном патогенезе [10, 15]. Кроме того, ферментативные и неферментативные компоненты антиоксидантной системы защищают организм на-

секомых от повреждения активными формами кислорода (АФК), которые образуются при нарушении целостности тканей токсинами патогена, а также при активации защитных реакций фагоцитоза, меланизации, инкапсуляции [20–22].

Микробиота кишечника играет важную роль в жизнедеятельности насекомых и может быть дополнительным фактором, усиливающим вирулентность бактерий *Bt*. Состав микробиоты у особей одного вида насекомых может различаться в пределах ареала. Кишечный микробиом личинок колорадского жука включает в себя представителей бактерий семейства *Enterobacteriaceae* [23], *Lactococcus* [24] и *Spiroplasma* [24, 25]. Бактерии рода *Citrobacter* считаются типичным представителем нормальной микробиоты насекомых, включая колорадского жука [26]. В ряде сообщений описывается влияние эндосимбионтов на различные аспекты биологии насекомых, такие как чувствительность к тепловому стрессу и другим факторам окружающей среды [27], питание [28, 29], генетическая дифференциация [30] и размножение [31]. Кроме того, симбиотические микроорганизмы могут играть важную роль в иммунитете насекомых. Микробиота кишечника насекомых – один из основных факторов, определяющих устойчивость хозяина к микроорганизмам, которые оказывают свое инсектицидное действие через кишечник [32]. Установлено, что рекомбинантный штамм *B. subtilis* 26ДCry, содержащий ген δ -эндотоксина Cry1Ia из *Bt* var. *kurstaki*, сочетал продукцию Cry-токсина и способность исходного штамма *B. subtilis* 26Д подавлять развитие симбионтных микроорганизмов колорадского жука и иммунные реакции насекомого, что и приводило к высокой смертности фитофага [33]. В исследовании о влиянии бактерий *B. thuringiensis* на микробиом колорадского жука, наблюдались резкие изменения в бактериальном сообществе, связанные со снижением относительной численности эндосимбиотических бактерий *Spiroplasma leptinotarsae*, а также резким повышением численности бактерий семейства *Enterobacteriaceae* при бактериозе [24]. Существуют значительные различия в восприимчивости к токсинам *B. thuringiensis* у личинок *Helicoverpa armigera* из разных мест обитания и при питании на разных растениях, что может быть связано с изменением микробиоты кишечника, участвующей в метаболизме питательных веществ у насекомых, и активацией / деградацией токсинов *Bt* [34].

Изменчивые географические условия (совокупность природных факторов или свойств географической среды, включающих: географическое положение территории; природные ресурсы; рельеф; климат; почвы и др.) могут разделить популяцию насекомых на разные экологические типы. Различия между этими экологическими типами

могут быть связаны с экологической адаптивностью, устойчивостью к инсектицидам и морфометрическими показателями, а именно скоростью роста, развитием и размножением насекомых [35, 36]. Широкий адаптивный потенциал определяется высокой степенью генетического, биохимического и фенотипического полиморфизма [37, 38], в результате чего у колорадского жука может формироваться различная стратегия защиты от патогенов, в частности, бактерий. Это может иметь важное значение, как для планирования защитных мероприятий, так и для прогноза численности вредителя. Несмотря на обширные знания о том, как бактерии *B.thuringiensis* проявляют свою вирулентность, и как личинки колорадского жука реагируют на инфекцию, имеется недостаточно данных о восприимчивости к бактериям *B.thuringiensis* насекомых из разных географических точек ареала, особенно достаточно удаленных (сотни и тысячи км).

Целью работы является оценка показателей иммунитета, активности ферментов антиоксидантной и детоксицирующей систем, а также изучение состава кишечной микробиоты и восприимчивости к бактериям *Bacillus thuringiensis* у личинок колорадского жука из разных популяций географически удаленных районов Новосибирской области.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагенты

В работе использовали восстановленный глутатион, 3-хлор-2,4-динитробензойная кислота (ДНХБ) (Sigma, США), п-нитрофенил ацетат (р-НФА) (Sigma, США), бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma, США), дигидроксифенилаланин (L-ДОФА) (Sigma, США), перекись водорода 0.1% (H_2O_2) (ООО Реактив, РФ), фенилтиомочевина (ФТМ) (Sigma, США), антикоагулянт (АК) рН 4,5 (NaCl, натрий лимоннокислый $Na_3C_6H_5O_7$ (ДИАЭМ, РФ), глюкоза (ДИАЭМ, РФ), ЭДТА (Sigma, США), дистиллированная вода), 10мМ фосфатный буфер (ФБ) рН 7,2 (гидроортофосфат натрия Na_2HPO_4 хлорид натрия NaCl, дистиллированная вода) (ООО Реактив, РФ), этиловый спирт 96% (ОАО “Кемеровская фармацевтическая фабрика”, РФ).

Насекомые

Личинок колорадского жука третьего возраста собирали с посадок картофеля *Solanum tuberosum*, свободного от обработок инсектицидами, в двух разных точках Новосибирской области: Ордынский район (п. Пролетарский: (54°22'57"с.ш. 81°09'41"в.д.) и Венгеровский район (г. Венгерово: 55°41'05" с.ш 76°44'49" в.д.). Личинок содержали в вентилируемых пластиковых контейнерах объемом 300 мл (по 10 насекомых в одном контейнере) при 12/12-часовом цикле свет/темнота при 25°C, с по-

стоянным доступом к кормовому растению – листьям картофеля, которые собирали в тех же посадках, где собирали насекомых. Картофельные листья помещали в пробирки 1.5 мл с водой и заменяли ежедневно на свежие. Для экспериментов использовали личинок четвертого возраста, через 4-6 ч после линьки [10, 39].

Бактерии и заражение насекомых

Для заражения насекомых использовали бактерии *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni*, из коллекции лаборатории биологической защиты растений и биотехнологии Новосибирского ГАУ. Бактерии культивировали на чашках с агаризованной средой Лурии–Бертани (LB, 1.5% агар, 1% триптона, 0.5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl, рН 7.0) в течение 5 суток при 28°C до полного формирования спор и кристаллов. Споры и кристаллы бактерий собирали с ИПС, отмывали от клеточных компонентов и компонентов среды трехкратно в физиологическом растворе (0.9% NaCl), осаждая при 4°C 6000g. В полученной суспензии спор и кристаллов бактерий подсчитывали титр методом посева на ИПС серийного разведения. Для подсчета титра бактерий в качестве ИПС была использована агаризованная среда LB. Способность бактерий *B. thuringiensis* продуцировать параспоральные включения, форму и размер кристаллов оценивали с помощью световой микроскопии в фиксированных, окрашенных карболовым эозином препаратах. Соотношение спор и кристаллов бактерий составляло 1:1. Кристаллический эндотоксин *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* содержит токсин Cry3A (размер 65 кДа), являющимся специфичным для отряда Coleoptera.

Пероральное заражение личинок колорадского жука споро-кристаллической смесью бактерий в физиологическом растворе проводили однократно путем принудительного скармливания с помощью тупоконечной иглы (30G) и шприцевого насоса (KDS 100, KD Scientific). Каждой личинке скармливали 10 мкл суспензии. Для сравнения чувствительности насекомых из разных частей Новосибирской области использовали титр 10^6 спор и кристаллов бактерий на личинку, 100 насекомых на вариант, разделенных на 10 повторностей. Контрольной группе насекомых скармливали 10 мкл физиологического раствора. После инфицирования насекомых, ежедневно заменяли картофельные листья (которые собирали в тех же посадках, где собирали насекомых), помещенные в пробирки 1,5 мл с водой. Личинок содержали при 25°C. Учет смертности личинок производили в течение 6 суток после заражения. Через 48 ч после инфицирования личинок колорадского жука бактериями *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* у насекомых отбирали гемолимфу для изучения иммунного ответа.

Анализ активности фенолоксидаз в плазме гемолимфы

Перед отбором гемолимфы поверхность тела насекомых стерилизовали 70% этанолом. Отбор гемолимфы проводили, прокалывая четвертый вентральный сегмент кутикулы тела насекомых стерильным скарификатором, и собирая выступившую каплю гемолимфы пипеткой со стерильным наконечником. Индивидуально с каждой личинки отбирали по 20 мкл гемолимфы в стерильную пробирку, содержащую 10 мкл 10мМ ФБ. Полученную суспензию центрифугировали при 4°C в течение 5 мин при 500 g. Надосадочную жидкость использовали для определения активности ферментов. Активность фенолоксидазы (ФО) в плазме гемолимфы определяли по методу Ashida и Söderhäll [40] с использованием L-ДОФА как субстрат. Образцы (5 мкл) инкубировали в течение 15 мин с 200 мкл 10 мМ L-ДОФА при 28°C, затем измеряли оптическую плотность при 490 нм. Использовали 20 насекомых на вариант.

Анализ лизоцим-подобной антибактериальной активности в плазме гемолимфы

Индивидуально с каждой личинки отбирали 10 мкл гемолимфы в 2 мкл охлажденного ФБ, содержащего фенилтиомочевину (ФТМ) (4мг/мл). Полученную суспензию центрифугировали при 4°C в течение 5 мин при 500 g. 6 мкл плазмы, свободной от гемоцитов, помещали в лунку на агаризованной (1.5%) пластинке, содержащей лиофилизированные бактерии *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, США) (40 мг на 10 мл физиологического раствора - 0,9% NaCl) [41]. Агаризованные пластинки инкубировали при 37°C в течение 18ч. Лизоцим-подобную активность гемолимфы определяли по диаметру зоны лизиса *M. lysodeikticus*. Для построения калибровочной кривой использовали лизоцим яичного белка. Использовали 20 насекомых на вариант.

Общее количество гемоцитов

Индивидуально с каждой личинки отбирали 10 мкл гемолимфы в 20 мкл охлажденного антикоагулянта (62 мМ NaCl, 100 мМ глюкоза, 10 мМ ЭДТА, 30 мМ цитрат натрия, 26 мМ лимонная кислота, рН 4.5) (АК) с фенилтиомочевинной (ФТМ) (4мг/мл). Подсчет общего числа гемоцитов проводили в камере Горяева. Общее количество гемоцитов представляли как количество гемоцитов на 1 мл гемолимфы. Использовали 15 насекомых на вариант.

Приготовление образцов кишечника и жирового тела

Для приготовления гомогенатов кишечника и жирового тела насекомых препарировали в ох-

лажденном ФБ. Образцы готовили индивидуально (весь кишечник без содержимого в одном образце, $n = 20$ на каждый вариант). Кишечники помещали в 100 мкл фосфатного буфера. Извлеченные органы разрушали с помощью ультразвукового гомогенизатора (SONICATOR q125 (QSonica, США) в течение 10с при амплитуде 90%, трехкратно). Гомогенаты тканей центрифугировали в течение 15 мин при 4°C, 10000g. Полученную надосадочную жидкость использовали для определения активности ферментов.

Определение активности каталазы, неспецифических эстераз, ГСТ в образцах кишечника и жирового тела

Активность каталазы определяли спектрофотометрически при 240 нм по скорости разложения H_2O_2 [42]. К 200 мкл реакционной смеси ФБ с 0.5 % H_2O_2 добавляли образец 5 мкл и инкубировали 10 мин при 28°C.

Активность неспецифических эстераз определяли по скорости гидролиза п-нитрофенилацетата согласно Prabhakaran et al. [43] с изменениями [44]. 5 мкл образца инкубировали в течение 10 мин с 200 мкл п-нитрофенилацетата при 28°C, оптическую плотность измеряли при 410 нм.

Активность ГСТ определяли по скорости увеличения концентрации 5-(2,4-динитрофенил)-глутатиона, продукта реакции динитрохлорбензойной кислоты (ДНБ) и восстановленного глутатиона, катализируемой глутатионом [45]. Инкубацию образца объемом 10 мкл проводили с 1 мМ глутатиона и 1 мМ ДНБ при 25 °C в течение 5 мин, оптическую плотность измеряли при 340 нм.

Концентрацию белка в гомогенатах кишечника, жирового тела и образцах гемолимфы определяли методом Брэдфорда [46] с использованием бычьего сывороточного альбумина (БСА) для построения калибровочной кривой, оптическую плотность измеряли при 590 нм.

Удельную активность ферментов выражали в единицах изменения оптической плотности инкубационной смеси в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка [47]. Использовали 20 насекомых на каждый вариант.

Анализ кишечной микробиоты

Для изучения микробиоты кишечника был использован общепринятый метод метабаркодинга гена 16S представителей бактериального сообщества [39, 48]. У личинок, прошедших поверхностную стерилизацию, извлекали средний отдел кишечника с неповрежденным содержимым (по пять личинок на образец). ДНК из образцов кишечника насекомых выделяли с помощью набора DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Hilden, Германия) в соответ-

ствии с инструкцией производителя. Использовали три повторности на вариант (5 насекомых в каждой повторности). Для механического разрушения образца использовали TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Германия) 10 мин при 30 Герц. Качество ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле, а количество – на флуориметре Qubit (Life Technologies, США) и спектрофотометре Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, США).

Для амплификации региона V3-V4 гена 16S рРНК использовали праймеры 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'), содержащих адаптерные последовательности (Illumina, США), линкер и баркод [49]. Амплификацию проводили в 50 мкл реакционной смеси в условиях, описанных ранее [50]. Ампликоны смешивали по 200 нг каждый и чистили в 1% агарозном геле с помощью набора MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Германия). Секвенирование проводили в ЦКП "Геномика" (ИХБФМ СО РАН) на секвенаторе MiSeq (Illumina, США), используя набор Reagent Kit v3 (2x300, Illumina, USA).

Полученные парные последовательности анализировали с помощью UPARSE скриптов [51], используя Usearch v11.0.667 [52]. Биоинформатическая обработка включала перекрывание парных ридов, фильтрацию по качеству и длине, учет одинаковых последовательностей, отбрасывание синглетонов, удаление химер и получение операциональных таксономических единиц (ОТЕ) с помощью алгоритма кластеризации UPARSE. Таксономическую принадлежность последовательностей (ОТЕ) определяли с помощью SINTAX [53] с использованием 16S RDP training set v18 в качестве референсной базы [54] Таксономическую структуру полученного таким образом ансамбля 16S последовательностей оценивали путем вычисления отношения числа таксон-специфичных последовательностей к общему числу последовательностей образца, выраженному в процентах.

Статистическая обработка данных

Для проверки нормальности распределения данных использовали тест Д'Агостино (D'Agostino & Pearson omnibus normality test) и критерий Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk normality test). Для сравнения динамики смертности насекомых при заражении бактериями использовали метод Каплана Майера. Логарифмический критерий Мантла-Кокса использовался для количественной оценки различий в уровнях смертности. Для сравнения обилия состава микробиоты в кишечнике насекомых использовали однофакторный дисперсионный анализ с тестом Дана (Dunn's multiple comparisons test). Для сравнения данных с нормаль-

ным распределением использовали однофакторный дисперсионный анализ тестом Тьюки (one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test). Для расчетов использовали программу GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартной ошибки среднего. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.0001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Показатели иммунитета, детоксицирующей и антиоксидантной систем у личинок колорадского жука

При сравнении показателей иммунитета в гемолимфе личинок колорадского жука, собранных в двух районах Новосибирской области, было зарегистрировано достоверное большее значение общего количества гемоцитов в 1.6 раза ($p < 0.001$; $q = 6.37$; $df = 54$), а также лизоцим-подобной антибактериальной активности в 2 раза ($p < 0.05$; $q = 4.43$; $df = 67$) у насекомых из Венгеровского района по сравнению с личинками Ордынского района. При сравнении активности ФО у личинок Венгеровского района и Ордынского района достоверных отличий не отмечено (Табл. 1).

В результате сравнения антиоксидантной и детоксицирующей систем насекомых отмечено достоверные различия в активности детоксицирующих ферментов: глутатион-S-трансферазы в 2.5 раза ниже ($p < 0.001$; $q = 6.9$; $df = 65$) и неспецифических эстераз в 1.7 раза ниже ($p < 0.0001$; $q = 7.02$; $df = 73$) в кишечнике личинок Венгеровского района по сравнению с группой насекомых из Ордынского района. В жировом теле насекомых между вариантами достоверных различий в активности данных ферментов не обнаружено. Активность антиоксидантного фермента каталазы в кишечнике и жировом теле насекомых, достоверно не различалась между насекомыми Ордынского и Венгеровского районов (табл. 1).

Микробиота кишечника колорадского жука

С помощью 16S метабаркодинга проведен анализ ДНК кишечной микробиоты у личинок колорадского жука из Венгеровского и Ордынского районов и было установлено, что в обеих группах насекомых доминирующими таксоном служат бактерии семейства *Enterobacteriaceae* $50.6 \pm 9.5\%$ и $36.5 \pm 5.0\%$, а также рода *Citrobacter* $24.6 \pm 10.3\%$ и $18.4 \pm 2.8\%$ соответственно (рис. 1). Бактерии рода *Acinetobacter*, *Myroides*, *Pseudomonas*, *Lactococcus*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas* и *Sphingobacterium* присутствовали в кишечнике насекомых обеих групп в меньших пропорциях 1–5% (рис. 1). Однако, стоит обратить внимание, что в кишечнике насекомых Ордынского

Таблица 1. Показатели клеточного и гуморального иммунитета в гемолимфе (общее количество гемоцитов), активность антибактериальной системы и фенолоксидаз (ФО), активность ферментов детоксицирующей (глутатион-s-трансферазы (ГСТ) и неспецифических эстераз) и антиоксидантной (ГСТ и каталазы) систем в кишечнике и жировом теле личинок колорадского жука Ордынского и Венгеровского районов Новосибирской области.

| Показатели | Ордынский район | Венгеровский район |
|---|----------------------|--------------------|
| | гемолимфа | |
| Общее число гемоцитов | 13866667 ± 904100*** | 22573333 ± 1062587 |
| Лизоцим-подобная антибактериальная активность | 0.015 ± 0.002* | 0.028 ± 0.003 |
| Фенолоксидазная активность | 0.138 ± 0.01 | 0.105 ± 0.009 |
| | кишечник | |
| Глутатион-s-трансферазная активность | 0.998 ± 0.135*** | 0.421 ± 0.05 |
| Активность неспецифических эстераз | 0.629 ± 0.035**** | 0.368 ± 0.031 |
| Каталазная активность | 1.92 ± 0.28 | 1.77 ± 0.36 |
| | жировое тело | |
| Глутатион-s-трансферазная активность | 1.036 ± 0.105 | 0.466 ± 0.057 |
| Активность неспецифических эстераз | 0.269 ± 0.021 | 0.1865 ± 0.019 |
| Каталазная активность | 1.082 ± 0.196 | 0.766 ± 0.120 |

Данные представлены, как среднее арифметическое значение и его ошибка. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа тестом Тьюки. * – $p < 0.05$; *** – $p < 0.001$; **** – $p < 0.0001$ – по сравнению с насекомыми Венгеровского района.

района также доминирующим таксоном отмечены бактерии рода *Spiroplasma* и составляют $30.6 \pm 7.8\%$, при этом в Венгеровской группе насекомых данного рода бактерий не обнаружено. Стоит отметить, что в кишечнике насекомых было обнаружено минорное присутствие (меньше 1%) бактерий рода *Enterococcus*, *Providencia*, *Empedobacter*, *Serratia*, *Vagococcus*, *Achromobacter*, *Delftia*, *Flavobacterium*, *Acidovorax*, *Alcaligenes*, *Melaminivora*, *Sphingomonas*, *Diphorobacter*, *Pseudarthrobacter*, *Brevundimonas*.

*Восприимчивость личинок колорадского жука из Венгеровского и Ордынского районов Новосибирской области к бактериям *B.thuringiensis**

При пероральном заражении насекомых Ордынского района споро-кристаллической смесью бактерий *Bt* ssp. *morrisoni* была зафиксирована смертность 35% на шестые сутки после заражения по сравнению с незараженной группой насекомых (Chi square, 8.54; $p < 0.01$). Смертность личинок колорадского жука Венгеровского района после заражения бактериями составила 30% на шестые сутки эксперимента по сравнению с незараженными насекомыми (Chi square, 9.18; $p < 0.01$) (рис. 2). Достоверных отличий в чувствительности насекомых из Венгеровского и Ордынского районов к бактериям *B.thuringiensis* отмечено не было (рис. 2).

*Иммунный ответ личинок колорадского жука при развитии бактериальной инфекции *B.thuringiensis**

При сравнении иммунного ответа в гемолимфе личинок колорадского жука из Ордынского и Венгеровского районов на вторые сутки после заражения бактериями были получены следующие данные. Установлено, что заражение бактериями *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* личинок колорадского жука из Ордынского района, приводило к достоверному ($p < 0.001$; $q = 6.49$; $df = 54$) увеличению общего количества гемоцитов в гемолимфе насекомых в 1,6 раза по отношению к контрольной группе (рис. 3).

При изучении лизоцим-подобной антибактериальной активности плазмы гемолимфы личинок колорадского жука на вторые сутки после заражения бактериями *B. thuringiensis* насекомых Ордынского и Венгеровского районов достоверных отличий по сравнению с незараженными насекомыми не зарегистрировано (рис. 4).

Показано достоверное увеличение активности ФО в плазме гемолимфы насекомых при скармлировании бактерий *B.thuringiensis* личинкам колорадского жука Ордынского и Венгеровского районов по сравнению с незараженными насекомыми в 2 ($p < 0.001$; $q = 5.69$; $df = 71$) и 2.8 раза соответственно ($p < 0.0001$; $q = 7.97$; $df = 71$) (рис. 5).

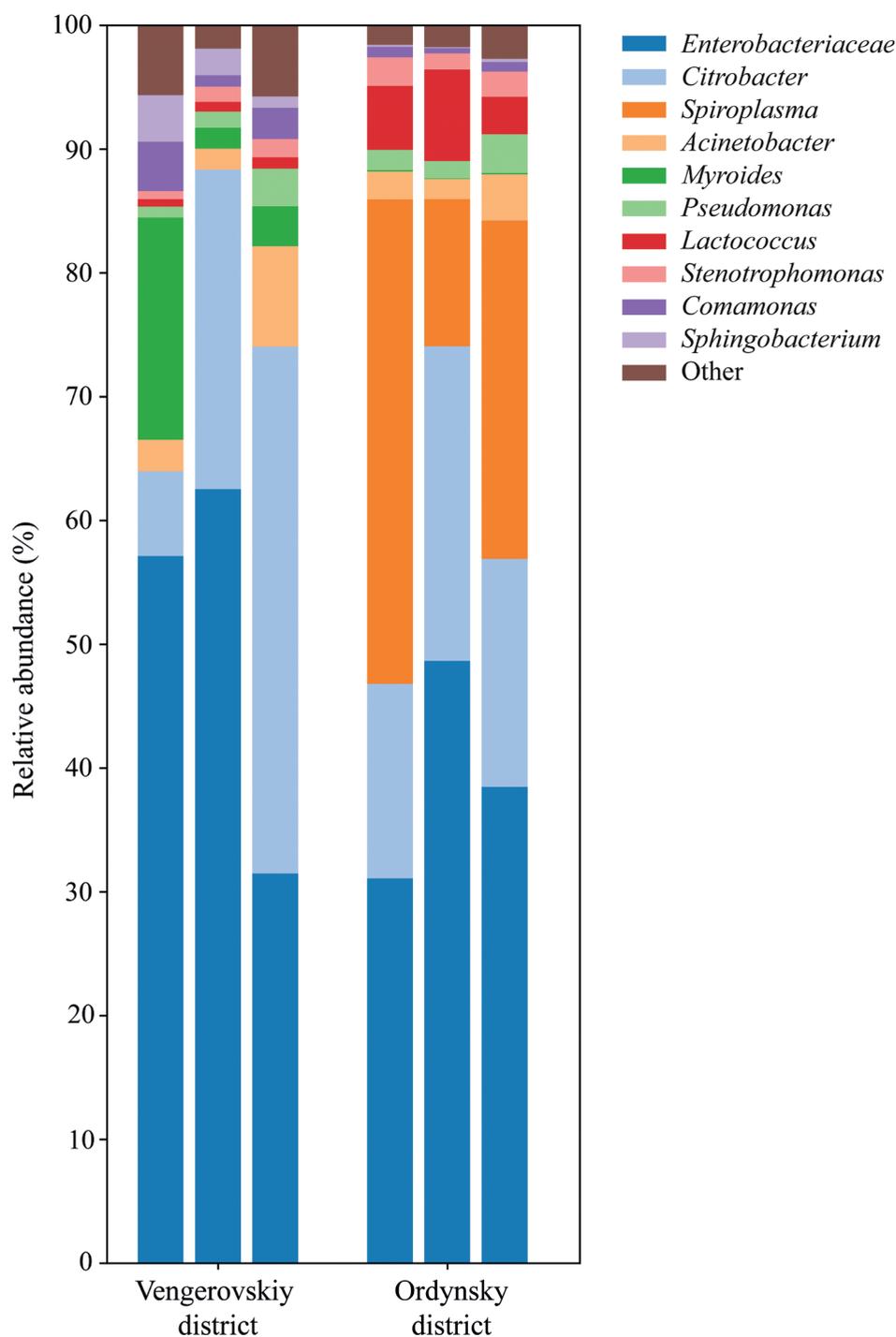


Рис. 1. Относительное обилие (%) бактерий в сообществах кишечной микробиоты колорадского жука из двух географических точек Новосибирской области (Венгеровский и Ордынский районы). Отображена встречаемость бактерий для трех биологических повторов (5 насекомых в каждой повторности).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведено сравнение базовых показателей клеточного и гуморального иммунитета в гемолимфе, активности ферментов антиоксидантной и детоксицирующей систем, микробиоты кишечника у личинок колорадского жука из разных популяций

географически удаленных районов Новосибирской области, а также сравнение их восприимчивости к бактериям *B. thuringiensis*. Значение базовых показателей общего количества гемоцитов и лизоцим-подобной антибактериальной активности в гемолимфе у насекомых Венгеровского района

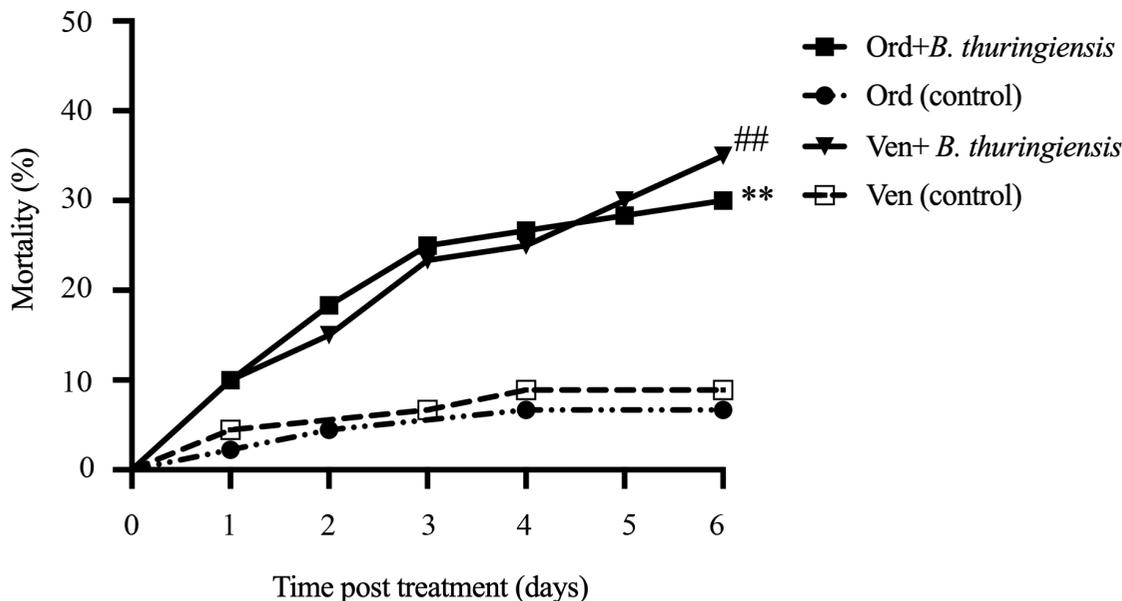


Рис. 2. Смертность личинок колорадского жука из двух географических точек Новосибирской области Ордынский район (Орд) и Венгеровский район (Вен) после перорального заражения споро-кристаллической смесью *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni*. Данные были проанализированы путем сравнения кривых с использованием логарифмических тестов (Мантел-Кокса) ($n = 100$ личинок на вариант). ** – $p < 0.01$ по сравнению с незараженными насекомыми Ордынского района (Орд контроль); ### – $p < 0.01$ по сравнению с незараженными насекомыми Венгеровского района (Вен контроль).

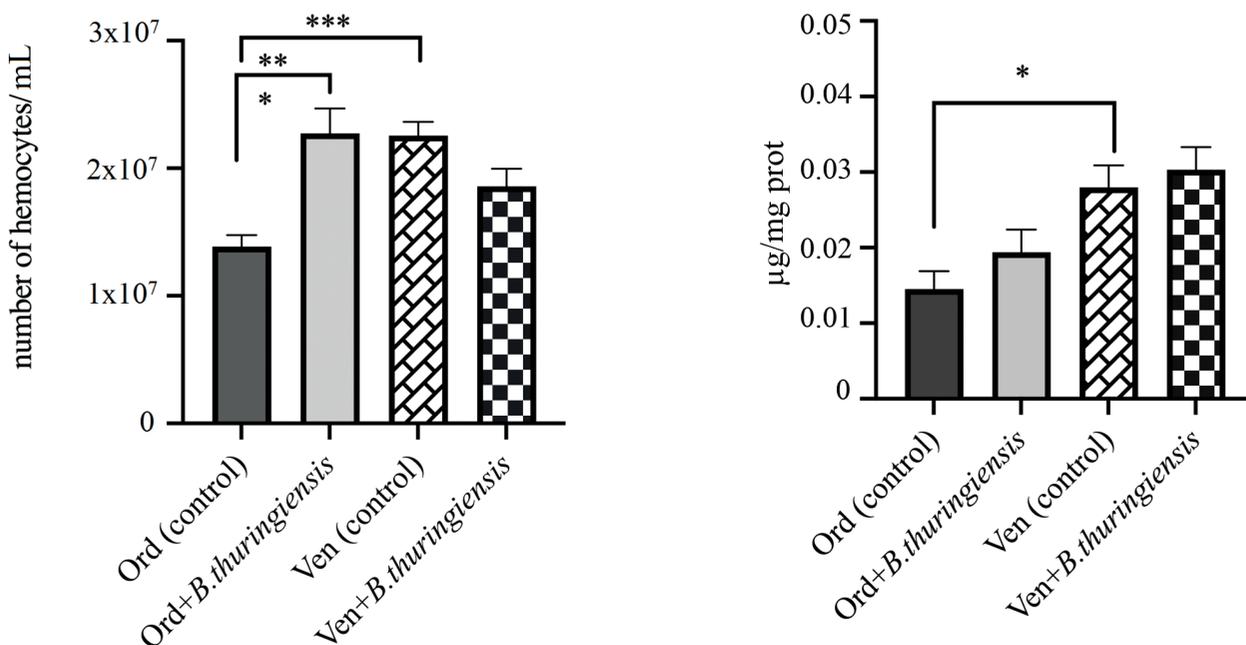


Рис. 3. Общее количество гемоцитов в гемолимфе личинок колорадского жука из двух географических точек Новосибирской области (Ордынский район (Орд) и Венгеровский район (Вен)) через 48 ч после перорального заражения споро-кристаллической смесью бактерий *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* (Орд+B. thuringiensis; Вен+B. thuringiensis). Данные представляют собой среднее арифметическое значение и его ошибку. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа тестом Тьюки. *** – $p < 0,001$ – по сравнению с незараженными насекомыми Ордынского района (Орд контроль).

Рис. 4. Лизоцим-подобная антибактериальная активность в плазме гемолимфы личинок колорадского жука из двух географических точек Новосибирской области (Ордынский район (Орд) и Венгеровский район (Вен)) через 48 ч после перорального заражения споро-кристаллической смесью бактерий *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* (Орд+B. thuringiensis; Вен+B. thuringiensis). Данные представляют собой среднее арифметическое значение и его ошибку. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа тестом Тьюки. * – $p < 0.05$ – по сравнению с незараженными насекомыми Ордынского района (Орд контроль).

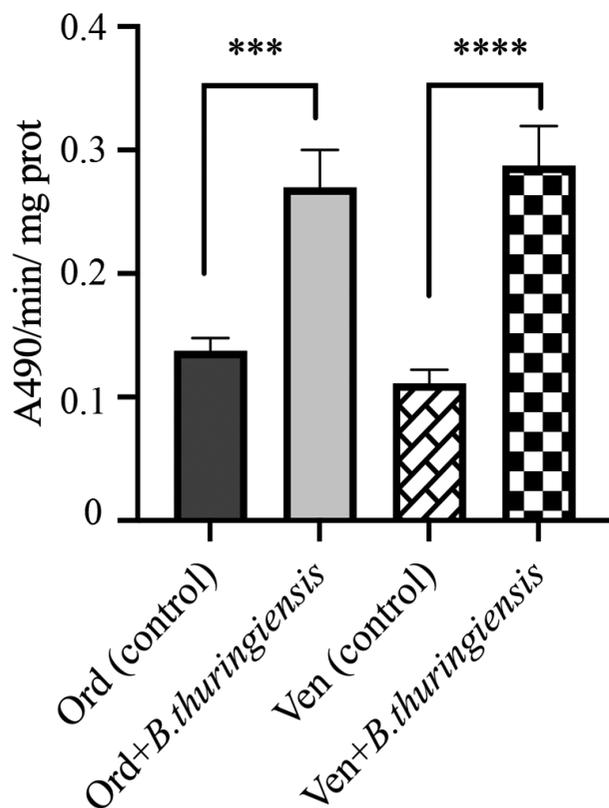


Рис. 5. Активность фенолоксидаз в плазме гемолимфы личинок колорадского жука из двух географических точек Новосибирской области (Ордынский район (Орд) и Венгеровский район (Вен)) через 48 часов после перорального заражения споро-кристаллической смесью бактерий *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* (Орд+*B. thuringiensis*; Вен+ *B. thuringiensis*). Данные представляют собой среднее арифметическое значение и его ошибку. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа тестом Тьюки. *** – $p < 0.001$ – по сравнению с незараженными насекомыми Ордынского района (Орд контроль); **** – $p < 0.0001$ – по сравнению с незараженными насекомыми Ордынского (Орд контроль) и Венгеровского районов (Вен контроль).

было достоверно выше по сравнению с личинками Ордынского района. В кишечнике и жировом теле у личинок с Ордынского района отмечена повышенная активность ферментов детоксицирующей системы по сравнению с Венгеровской группой насекомых. Показано, что доминирующей группой кишечной микробиоты в обоих районах выступают бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Citrobacter*, однако у личинок Ордынского района также преобладают бактерии рода *Spiroplasma*. В ходе исследования установлено, что насекомые не отличались чувствительностью к бактериям *B. thuringiensis*. Развитие бактериальной инфекции *B. thuringiensis* у личинок колорадского жука из разных районов Новосибирской области вызывает достоверное увеличение активности ФО в гемолимфе по сравнению с незараженными насекомыми,

при этом у Ордынской группы насекомых также регистрируются достоверное увеличение общего количества гемоцитов по отношению к контрольной группе насекомых. Таким образом, показано, что две группы насекомых из разных точек Новосибирской области, принадлежащие к одному виду, демонстрируют различия в показателях клеточного и гуморального иммунного ответа при заражении бактериями *B. thuringiensis*.

Различия в базовых показателях клеточного и гуморального иммунного ответа в гемолимфе насекомых ранее были показаны при сравнении двух географических популяций (меланисты и ахромисты) личинок большой вошинной огневки *Galleria mellonella* [55]. В своем исследовании, группа авторов показали различия в активности ферментов глутатион-S-трансферазы и альфа-эстеразы у полевых популяций комаров *Anopheles stephensi* из провинций Кунар и Нангархар в Афганистане при изучении устойчивости насекомых к различным группам инсектицидов [56]. Также в исследовании по изучению устойчивости к инсектицидам разных географических популяций одного вида насекомых, было показано различие базовых показателей ферментов глутатион-S-трансферазы и альфа-эстеразы и ацетилхолинэстеразы у капустной моли *Plutella xylostella*, комаров *Anopheles maculipennis*, египетской хлопковой совки *Spodoptera littoralis*, яблонной плодовой гусеницы *Cydia pomonella* (L.) и др. [57–60]. Таким образом, различия в активности базовых показателей защитных систем насекомых из различных частей ареала обитания могут быть обусловлены уровнем устойчивости насекомых к биологическим и химическим инсектицидам, применяемым там ранее.

В результате секвенирования и профилирования бактериального сообщества кишечной микробиоты личинок колорадского жука из Венгеровского и Ордынского районов было установлено, что доминирующая группа в обоих районах представлена бактериями семейства *Enterobacteriaceae*. Полученные результаты согласуются с другими исследованиями, в которых доминирующей группой бактерий кишечной микробиоты колорадского жука из разных мест обитания в Китае были бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Также данные для западно-сибирской популяции жука свидетельствуют о преобладании бактерий семейства *Enterobacteriaceae* [10, 23, 61]. В микробиоте колорадского жука из Венгеровского и Ордынского районов нами обнаружены бактерии рода *Citrobacter*, являющиеся типичным представителем нормальной микробиоты насекомых, включая колорадского жука [26]. Интересно отметить, что в кишечнике насекомых Ордынского района доминирующим таксоном ($30.6 \pm 7.8\%$) также выступают бактерии рода *Spiroplasma*, хотя у насекомых из Венгеровского района данные бакте-

рии в кишечнике отсутствуют. В работе Polenogova и соавт. отмечена высокая относительная численность бактерий *Spiroplasma leptinotarsae* (до 95%) в кишечнике личинок колорадского жука, собранного с частных картофельных полей (Новосибирская область, 53°44'3.534" с.ш., 77°39'0.0576" в.д.) [24]. Известно, что бактерии рода *Spiroplasma* являются облигатным эндосимбионтом колорадского жука [62]. Географическое расположение популяции насекомых может быть фактором, влияющим на уровень эндосимбионтов кишечника насекомых. В частности, в популяциях табачной белокрылки *Bemisia tabaci* численность кишечных эндосимбионтов рода *Candidatus*, *Portiera*, *Hamiltonella* и *Rickettsia* варьировала в зависимости от географического местоположения тестируемой популяции насекомого [63]. Также в популяциях каштанового долгоносика *Curculio sikkimensis* местный климат был фактором, влияющим на присутствие эндосимбионтных бактерий *Sodalis*, *Wolbachia* и *Rickettsia* [64]. Кроме того, было показано значительное различие микробных сообществ колорадского жука, собранного из разных мест в Китае [23].

Роль микробиоты насекомых в устойчивости к бактериальным и грибным инфекциям, химическим инсектицидам во многом зависит от видового состава микроорганизмов, условий выращивания хозяина и типа патогена [65–68]. Так, показано, что кишечные симбионты рода *Burkholderia* опосредуют устойчивость к инсектицидам у клопа *Riptortus pedestris* (Hemiptera), которая может передаваться горизонтально другим насекомым [66, 69]. Установлено, что некоторые штаммы бактерий *Citrobacter* sp., выделенные из кишечника мух *Bactrocera dorsalis* (Diptera), способны разлагать трихлорфон, повышали устойчивость насекомых к химическому инсектициду [70].

Симбиотические микроорганизмы могут играть важную роль в защите насекомых от паразитов и патогенов [71]. Было показано, что симбионты могут повысить устойчивость хозяина к чужеродным агентам, стимулируя или запуская иммунную систему насекомых [72, 73]. Исследования показали, что бактерии рода *Spiroplasma* могут активировать иммунные реакции у плодовых мух, запускать Toll-путь активации синтеза антимикробных белков [74, 75]. Показано, что бактерии рода *Spiroplasma* защищают *Drosophila neotestacea* от стерилизующего воздействия паразитической нематоды *Howardula* как в лаборатории, так и в полевых условиях [76]. Исследования свидетельствуют о том, что бактерии рода *Spiroplasma* распространяются в североамериканских популяциях мух *D. neotestacea* и происходят адаптивные изменения в защитных реакциях насекомых [76]. Было показано, что влияние бактерий данного рода на развитие инфекции связано с син-

тезом протеаз, которые задействованы в активации иммунитета хозяина, и такое влияние может быть защитным, нейтральным или отрицательным, в зависимости от возбудителя инфекции насекомых. Исходя из этого, можно сделать предположение о том, что повышенный уровень базовых показателей ГСТ и неспецифических эстераз в кишечнике Ордынской группы насекомых может быть связан с доминированием в кишечной микробиоте эндосимбионта рода *Spiroplasma*, который запускает активацию данных ферментов.

Популяции колорадского жука из Ордынского и Венгеровского районов Новосибирской области демонстрируют одинаковый уровень чувствительности к бактериям *B. thuringiensis*, при этом полученные результаты свидетельствуют о том, что бактериальная инфекция на уровне 30% смертности приводит к активации защитных реакций и различиям в иммунном ответе у насекомых из разных районов.

Известно, что клеточные и гуморальные иммунные реакции насекомых могут быть активированы системно в гемолимфе [14, 77, 78], а также локально в месте развития инфекции через синтез антимикробных пептидов, активацию детоксицирующих ферментов и регенерацию в кишечнике, кутикуле, трахеях [79–81]. Был показан вклад клеточных и гуморальных иммунных реакций при развитии бактериальной инфекции, вызванной *B. thuringiensis*, у личинок большой вошинной огневки *G. mellonella*, а также у личинок колорадского жука [14, 15, 77, 78]. Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют, что общее количество гемоцитов у личинок колорадского жука Венгеровского района достоверно выше, чем у насекомых из Ордынского района, при этом заражение бактериями *B. thuringiensis* приводит к достоверному увеличению общего количества гемоцитов в гемолимфе насекомых из Ордынского района по отношению к незараженным. Гемоциты принимают активное участие в таких клеточных иммунных реакциях, как фагоцитоз, инкапсуляция, синтез антимикробных белков и реакция меланизации. Повышенный базовый уровень общего количества гемоцитов у насекомых из Венгеровского района дает преимущество насекомым при защите от патогена, в отличие от популяции, насекомые которой вынуждены расходовать ресурс на пролиферацию клеток гемолимфы во время развития инфекционного процесса.

Кроме того, необходимо отметить, что у личинок колорадского жука Венгеровского района достоверно более высокая лизоцим-подобная антибактериальная активность в гемолимфе по сравнению с личинками Ордынского района. Лизоцим синтезируется постоянно в организме насекомых в различных тканях и органах, и его продукция увели-

чивается в ответ на инфекцию. Антимикробные пептиды могут действовать синергетически и приводить к бактериостатическому или бактериолитическому эффекту, главным образом, путем нарушения целостности клеточной стенки [16, 81].

Одна из ключевых защитных реакций насекомых при повреждении целостности тканей и при проникновении патогена, считается меланизация, опосредованная деятельностью ФО-активирующего каскада. Меланин и активные формы кислорода – продукты меланогенеза, которые образуются в процессе каскада ферментативных реакций, способны предотвратить рост микроорганизмов [82, 83]. При заражении бактериями *B. thuringiensis* личинок колорадского жука Ордынского и Венгеровского районов было отмечено увеличение ферментативной активности ФО в гемолимфе инфицированных насекомых. Повышение активности фенолоксидаз – одна из первых реакций защиты у насекомых при заражении бактериями *B. thuringiensis* [10, 78, 84]. Сублетальная и полулетальная инфекция *B. thuringiensis* личинок колорадского жука приводит к увеличению активности ФО в гемолимфе и экспрессии проФО в кишечнике [10, 15], что свидетельствует о важной роли данных ферментов в защите насекомых от бактериальной инфекции. Необходимо учитывать, что изменение активности ФО в гемолимфе при бактериальной инфекции может быть связано с активацией иммунной системы при токсическом действии бактериальных метаболитов [15, 78, 84, 85]. Повышенный уровень базовых показателей клеточного и гуморального иммунного ответа у личинок Венгеровского района может указывать на потенциально большую устойчивость к энтомопатогенам различной природы по сравнению с насекомыми Ордынского района.

Ранее установлено, что синтез и повышение активности неспецифических эстераз и ГСТ происходит для инактивации токсинов и токсических метаболитов при развитии бактериальной инфекции *B. thuringiensis* у личинок колорадского жука в жировом теле, как основном органе детоксикации [15], и в кишечнике, как первом и наиболее важном барьере при пероральной инфекции [10]. Кроме того, необходимо отметить, что повышенная активность данных ферментов является одним из ключевых факторов метаболической устойчивости насекомых к химическим инсектицидам [86, 87]. Ряд исследований указывают на то, что неспецифические эстеразы играют важную роль в механизмах формирования устойчивости в кишечнике личинок *G. Mellonella* и *H. armigera* к бактериям *B. thuringiensis* [18, 88]. Основная функция ГСТ заключается в защите клеток от ксенобиотиков и продуктов перекисного окисления липидов, что подтверждается в исследовании активности данного фермента у ли-

чинок колорадского жука при заражении спорами, токсином и споро-кристаллической смесью бактерий *B. thuringiensis* [10]. В нашей работе зарегистрирована более высокая базовая активность неспецифических эстераз и ГСТ в кишечнике личинок колорадского жука Ордынского района по сравнению с популяцией из Венгеровского района. Можно предположить, что более высокая активность детоксицирующих ферментов в кишечнике будет способствовать защите организма Ордынской группы насекомых при проникновении бактерий *B. thuringiensis*.

Антиоксидантная система имеет решающее значение для контроля окислительно-восстановительного баланса, поскольку ферментативные и неферментативные антиоксиданты контролируют уровень АФК во время развития инфекционных процессов и иммунных реакций насекомых [10, 47, 89]. Следует отметить, что каталаза принимает участие в инактивации перекиси водорода [90, 91]. В кишечнике личинок колорадского жука было показано, участие неферментативных тиоловых антиоксидантов в защите от бактериоза, вызванного *B. thuringiensis* [10]. При изучении бактериальной инфекции на вошинной огневке было зарегистрировано достоверное снижение активности каталазы в кишечнике, авторы предполагают, что это связано с подавлением активности данного фермента в результате высокого уровня образования супероксидных радикалов во время окислительного стресса на острой стадии бактериоза [47]. Поддержание окислительно-восстановительного баланса в кишечнике личинок колорадского жука, регулируемое антиоксидантной системой, имеет решающее значение как для защитных насекомых от *Bt*, так и для защиты собственных клеток от АФК [10]. Мы установили, что у насекомых Ордынского района понижены базовые показатели гуморального и клеточного иммунного ответа по сравнению с Венгеровской группой насекомых, несмотря на это, вероятно, защита при развитии бактериальной инфекции, может эффективно осуществляться за счет более высокой базовой активности ферментов детоксицирующей системы, а именно неспецифических эстераз и ГСТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Популяции колорадского жука из Ордынского и Венгеровского районов Новосибирской области демонстрируют одинаковый уровень чувствительности к бактериям *B. thuringiensis*. Вероятно, в связи с тем, что личинки колорадского жука Венгеровского района имеют изначально более высокий базовый уровень показателей иммунитета, при проникновении патогена происходит повышение активности защитных реакций для ликвидации последствий заражения и предотвращения вторич-

ного заражения. При этом присутствие симбиотических бактерий рода *Spiroplasma* в кишечнике Ордынской группы насекомых, а также высокие базовые показатели ферментов детоксицирующей системы могут быть задействованы в защите от бактериальной инфекции *B. thuringiensis*. Это свидетельствует о том, что насекомые одного вида из разных частей ареала могут эффективно “перестраивать” защитную стратегию от энтомопатогенов, за счет баланса между конституциональными и индуцированными показателями резистентности.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Д.И.М.), сбор данных (Т.Д.С., Г.Е.В., Ш.Е.В., А.Т.Ю., К.М.Р.), обработка данных (К.М.Р., Д.И.М.), написание и редактирование манускрипта (Т.Д.С., Г.Е.В., К.М.Р., Д.И.М.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека и ли животных.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа по изучению иммунного ответа насекомых и восприимчивости личинок колорадского жука к бактериям *Bacillus thuringiensis* выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-16-20031) и Правительства Новосибирской области (№ р-4), биоинформатическая обработка NGS данных была выполнена в рамках ГЗ ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alyokhin A, Rondon SI, Gao Y (2022) Insect Pests of Potato: Global Perspectives on Biology and Management. Academic Press 2nd Ed, London, 501.
2. Schoville SD, Chen YH, Andersson MN, Benoit JB, Bhandari A, Bowsher JH, Brevik K, Cappelle K, Chen MJM, Childers AK, Childers C, Christiaens O, Clements J, Didi-on EM, Elpidina EN, Engsontia P, Friedrich M, García-Robles I, Gibbs RA, Goswami C, Grapputo A, Gruden K, Grynberg M, Henrissat B, Jennings EC, Jones JW, Kalsi M, Khan SA, Kumar A, Li F, Lombard V, Ma X, Martynov A, Miller NJ, Mitchell RF, Munoz-Torres M, Muszewska A, Oppert B, Palli SR, Panfilio KA, Pauchet Y, Perkin LC, Petek M, Poelchau MF, Record É, Rinehart JP, Robertson HM, Rosendale AJ, Ruiz-Arroyo VM, Smagghe G, Szendrei Z, Thomas GWC, Torson AS, Vargas Jentszsch IM, Weirauch MT, Yates AD, Yocum GD, Yoon JS, Richards S (2018) A model species for agricultural pest genomics: the genome of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Scientific Reports* 8 (1): 1931. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20154-1>
3. Izzo VM, Chen YH, Schoville SD, Wang C, Hawthorne DJ (2018) Origin of Pest Lineages of the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Econ Entomol* 111 (2): 868–878. <https://doi.org/10.1093/jee/tox367>
4. Molnar I, Rakosy-Tican E (2021) Difficulties in Potato Pest Control: The Case of Pyrethroids on Colorado Potato Beetle. *Agronomy* 11(10): 1920. <https://doi.org/10.3390/agronomy11101920>
5. Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH (2007) *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J Microbiol Biotechnol* 17(4): 547–559.
6. Domínguez-Arrizabalaga M, Villanueva M, Escriche B, Ancín-Azpilicueta C, Caballero P (2020) Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Proteins against Coleopteran Pests. *Toxins* 12(7): 430. <https://doi.org/10.3390/toxins12070430>
7. Crickmore N, Berry C, Panneerselvam S, Mishra R, Connor TR, Bonning BC (2021) A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 186:107438. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438>
8. Dubovskiy IM, Grizanova EV, Gerasimova SV (2023) Plant recombinant gene technology for pest control in XXI century: from simple transgenesis to CRISPR/Cas. In: Kumar A, Arora S, Ogita S, Yau Y-Y, Mukherjee K (eds) *Gene editing in plants: CRISPR-Cas and its applications*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-8529-6_2
9. Kumar P, Kamle M, Borah R, Mahato DK, Sharma B (2021) *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. *Egypt J Biol Pest Control* 31: 95. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00440-3>
10. Dubovskiy IM, Grizanova EV, Tereshchenko D, Krytsyna TI, Alikina T, Kalmykova G, Kabilov M, Coates CJ (2021) *Bacillus thuringiensis* spores and Cry3A toxins act synergistically to expedite Colorado potato beetle mortality. *Toxins* (Basel) 13(11): 746. <https://doi.org/10.3390/toxins13110746>
11. Bravo A, Gill SS, Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49(4):423–435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
12. Soberón M, Gill SS, Bravo A (2009) Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(8):1337–1349. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8330-9>
13. Ruiz-Arroyo VM, García-Robles I, Ochoa-Campuzano C, Goig GA, Zaitseva E, Baaken G, Martínez-Ramírez AC, Rausell C, Real MD (2017) Validation of ADAM10 metalloprotease as a *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin functional receptor in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Insect Mol Biol* 26(2):204–214. <https://doi.org/10.1111/imb.12285>
14. García-Robles I, De Loma J, Capilla M, Roger I, Boix-Montesinos P, Carrión P, Vicente M, López-Galiano MJ, Real MD, Rausell C (2020) Proteomic insights into the

- immune response of the Colorado potato beetle larvae challenged with *Bacillus thuringiensis*. *Dev Comp Immunol* 104:103525. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103525>
15. *Yaroslavtseva ON, Dubovskiy IM, Khodyrev VP, Duisembekov BA, Kryukov VY, Glupov VV* (2017) Immunological mechanisms of synergy between fungus *Metarhizium robertsii* and bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* on Colorado potato beetle larvae. *J Insect Physiol* 96:14-20. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.10.004>
 16. *Hillyer JF* (2016) Insect immunology and hematopoiesis. *Dev Comp Immunol*. 58: 102–118. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>
 17. *Marmaras VJ, Lampropoulou M* (2009) Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell Signal* 21(2): 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.08.014>
 18. *Grizanova EV, Krytsyna TI, Surcova VS, Dubovskiy IM* (2019) The role of midgut nonspecific esterase in the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 166:107208. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107208>
 19. *Hoffman RL* (2003) A new genus and species of trigoniuline milliped from Western Australia (Spirabolida: Pachybolidae: Trigoniulinae). *Records of the Western Australian Museum* 22 (1): 17–22. [https://doi.org/10.18195/issn.0312-3162.22\(1\).2003.017-022](https://doi.org/10.18195/issn.0312-3162.22(1).2003.017-022)
 20. *Felton GW, Summers CB* (1995) Antioxidant systems in insects. *Arch Insect Biochem Physiol* 29(2): 187–197. <https://doi.org/10.1002/arch.940290208>
 21. *Krishnan N, Kodrik D* (2006) Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *J Insect Physiol* 52(1): 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.08.009>
 22. *Krishnan N, Kodrik D, Turanli F, Sehna F* (2007) Stage-specific distribution of oxidative radicals and antioxidant enzymes in the midgut of *Leptinotarsa decemlineata*. *J Insect Physiol* 53(1): 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.10.001>
 23. *Yu Y, Wang Y, Li H, Yu X, Shi W, Zhai J* (2021) Comparison of Microbial Communities in Colorado Potato Beetles (*Leptinotarsa decemlineata* Say) Collected From Different Sources in China. *Front Microbiol* 12:639913. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.639913>
 24. *Polenogova OV, Noskov YA, Yaroslavtseva ON, Kryukova NA, Alikina T, Klementeva TN, Andrejeva J, Khodyrev VP, Kabilov MR, Kryukov VY, Glupov VV* (2021) Influence of *Bacillus thuringiensis* and avermectins on gut physiology and microbiota in Colorado potato beetle: Impact of enterobacteria on susceptibility to insecticides. *PLoS One* 16(3): e0248704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248704>
 25. *Wang GH, Berdy BM, Velasquez O, Jovanovic N, Alkhaliifa S, Minbiole KPC, Brucker RM* (2020) Changes in Microbiome Confer Multigenerational Host Resistance after Sub-toxic Pesticide Exposure. *Cell Host Microbe* 27(2):213–224.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.01.009>
 26. *Muratoglu H, Demirbag Z, Sezen K* (2011) The first investigation of the diversity of bacteria associated with *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biologia* 66: 288–293. <https://doi.org/10.2478/s11756-011-0021-6>
 27. *Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH* (2002) Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol Entomol* 27: 189–195. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2002.00393.x>
 28. *Koga R, Tsuchida T, Fukatsu T* (2003) Changing partners in an obligate symbiosis: A facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proceedings. Biol sci The Royal Society* 270: 2543–2550. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2537>
 29. *Brownlie JC, Cass BN, Riegler M, Witsenburg JJ, Iturbe-Ormaetxe I, McGraw EA, O'Neill SL* (2009) Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. *PLoS Pathog* 5(4): e1000368. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000368>
 30. *Charlat S, Duploux A, Hornett EA, Dyson EA, Davies N, Roderick GK, Wedell N, Hurst GD* (2009) The joint evolutionary histories of *Wolbachia* and mitochondria in *Hypolimnas bolina*. *BMC Evol Biol* 9: 64. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-64>
 31. *White JA, Kelly SE, Perlman SJ, Hunter MS* (2009) Cytoplasmic incompatibility in the parasitic wasp *Encarsia inaron*: Disentangling the roles of *Cardinium* and *Wolbachia* symbionts. *Heredity* 102: 483–489. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.5>
 32. *Li S, Xu X, De Mandal S, Shakeel M, Hua Y, Shoukat RF, Fu D, Jin F* (2021) Gut microbiota mediate *Plutella xylostella* susceptibility to *Bt Cry1Ac* protoxin is associated with host immune response. *Environmental Pollution* 271: 116271. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116271>
 33. *Sorokan' A, Benkovskaya G, Blagova D, Maksimova T, Maksimov I* (2018) Defense Responses and Changes in Symbiotic Gut Microflora in the Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata* under the Effect of Endophytic Bacteria from the Genus *Bacillus*. *J Evol Biochem Physiol* 54: 300–307. <https://doi.org/10.1134/S0022093018040063>
 34. *Gujar GT, Mittal A, Kumari A, Kalia V* (2004) Host crop influence on the susceptibility of the American bollworm, *Helicoverpa armigera*, to *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-73. *Entomol Exp Appl* 113:165–172. <https://doi.org/10.1111/j.0013-8703.2004.00223.x>
 35. *Tu XY, Xia QW, Chen C, He HM, Xue F, Sen* (2015) Geographic variation in developmental duration of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guené) (Lepidoptera: Crambidae) in China. *Acta Ecologica Sinica* 35(2): 324–332. <https://doi.org/10.5846/stxb201303260512>
 36. *Xia X, Sun B, Gurr GM, Vasseur L, Xue M, You M* (2018) Gut microbiota mediate insecticide resistance in the diamond-back moth, *Plutella xylostella* (L.). *Front Microbiol* 9: 25. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00025>

37. *Benkovskaya G, Dubovskiy I* (2020) Spreading of colorado potato beetle resistance to chemical insecticides in siberia and history of its settling in the secondary area. *Plant Protection News* 103: 37–39. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-1-37-39>
38. *Yang F, Crossley MS, Schrader L, Dubovskiy IM, Wei S, Zhang R* (2022) Polygenic adaptation contributes to the invasive success of the Colorado potato beetle. *Mol Ecol* 31: 5568–5580. <https://doi.org/10.1111/mec.16666>
39. *Shatalova EI, Grizanova EV, Dubovskiy IM* (2022) The Effect of Silicon Dioxide Nanoparticles Combined with Entomopathogenic Bacteria or Fungus on the Survival of Colorado Potato Beetle and Cabbage Beetles. *Nanomaterials* 12(9): 1558. <https://doi.org/10.3390/nano12091558>
40. *Ashida M, Söderhäll K* (1984) The prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Ashida, M., & Söderhäll, K.* (1984). The prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comp Biochem Physiol Part B: Comp Biochem* 77(1): 21–26. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(84\)90217-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(84)90217-7)
41. *Wojda I, Kowalski P, Jakubowicz T* (2004) JNK MAP kinase is involved in the humoral immune response of the greater wax moth larvae *Galleria mellonella*. *Arch Insect Biochem Physiol* 56(4): 143–154. <https://doi.org/10.1002/arch.20001>
42. *Wang Y, Oberley LW, Murhammer DW* (2001) Antioxidant defense systems of two lipidopteran insect cell lines. *Free Radic Biol Med* 30(11): 1254–1262. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00520-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00520-2)
43. *Prabhakaran SK, Kamble ST* (1993) Activity and electrophoretic characterization of esterases in insecticide-resistant and susceptible strains of German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*). *J Econ Entomol* 86(4): 1009–1013. <https://doi.org/10.1093/jee/86.4.1009>
44. *Dubovskiy IM, Grizanova EV, Ershova NS, Rantala MJ, Glupov VV* (2011) The effects of dietary nickel on the detoxification enzymes, innate immunity and resistance to the fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Chemosphere* 85(1):92–96. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.039>
45. *Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB* (1974) Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249(22):7130–7139.
46. *Bradford MM* (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:.. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
47. *Dubovskiy IM, Martemyanov VV, Vorontsova YL, Rantala MJ, Gryzanova EV, Glupov VV* (2008) Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (*Lepidoptera, Pyralidae*). *Com Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* 148(1):1–5. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.02.003>
48. *Grizanova EV, Krytsyna TI, Kalmykova GV, Sokolova E, Alikina T, Kabilov M, Coates CJ, Dubovskiy IM* (2023) Virulent and necrotrophic strategies of *Bacillus thuringiensis* in susceptible and resistant insects, *Galleria mellonella*. *Microb Pathog* 175: 105958. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105958>
49. *Fadrosch DW, Ma B, Gajer P, Sengamalay N, Ott S, Brotman RM, Ravel J* (2014) An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome* 2(1):6. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-6>
50. *Lysko SB, Baturina OA, Naumova NB, Lescheva NA, Pleshakova VI, Kabilov MR* (2021) No-Antibiotic-Pectin-Based Treatment Differently Modified Cloaca Bacteriome of Male and Female Broiler Chickens. *Agriculture* 12:24. <https://doi.org/10.3390/agriculture12010024>
51. *Edgar RC* (2013) UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* 10(10):996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
52. *Edgar RC* (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
53. *Edgar R* (2016) SINTAX: a simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS sequences. *bioRxiv* 074161. <https://doi.org/10.1101/074161>
54. *Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR* (2007) Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73(16):5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
55. *Dubovskiy IM, Whitten MMA, Kryukov VY, Yaroslavtseva ON, Grizanova EV, Greig C, Mukherjee K, Vilcinskis A, Mitkovets PV, Glupov VV, Butt TM* (2013) More than a colour change: Insect melanism, disease resistance and fecundity. *Proc Royal Soc B: Biol Sci* 280(1763):20130584. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0584>
56. *Safi NHZ, Ahmadi AA, Nahzat S, Ziapour SP, Nikoogar SH, Fazeli-Dinan M, Enayati A, Hemingway J* (2017) Evidence of metabolic mechanisms playing a role in multiple insecticides resistance in *Anopheles stephensi* populations from Afghanistan. *Malar J* 16: 100. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1744-9>
57. *Sayani Z, Mikani A, Mosallanejad H* (2019) Biochemical Resistance Mechanisms to Fenvalerate in *Plutella xylostella* (*Lepidoptera: Plutellidae*). *J Econ Entomol* 112(3):1372–1377. <https://doi.org/10.1093/jee/toz025>
58. *Akiner MM* (2014) [Malathion and propoxur resistance in Turkish populations of the *Anopheles maculipennis* Meigen (*Diptera: Culicidae*) and relation to the insensitive acetylcholinesterase]. *Türkiye parazitolojii dergisi / Türkiye Parazitoloji Derneği = Acta parasitologica Turcica / Turkish Society for Parasitol* 38:111–115. <https://doi.org/10.5152/tpd.2014.3388>
59. *Moustafa MAM, Moteleb RIA, Ghoneim YF, Hafez SS, Ali RE, Eweis EEA, Hassan NN* (2023) Monitoring Resistance and Biochemical Studies of Three Egyptian Field Strains of *Spodoptera littoralis* (*Lepidoptera: Noctuidae*) to Six Insecticides. *Toxics* 11(3):211.

- <https://doi.org/10.3390/toxics11030211>
60. Yang XQ, Zhang YL (2015) Investigation of insecticide-resistance status of *Cydia pomonella* in Chinese populations. *Bull Entomol Res* 105(3): 316–325. <https://doi.org/10.1017/S0007485315000115>
61. Kryukov VY, Kabilov MR, Smirnova N, Tomilova OG, Tyurin MV, Akhanaev YB, Polenogova OV, Danilov VP, Zhangissina SK, Alikina T, Yaroslavtseva ON, Glupov VV (2019) Bacterial decomposition of insects post-Metarhizium infection: Possible influence on plant growth. *Fungal Biology* 123(12): 927–935. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.09.012>
62. Hackett KJ, Whitcomb RF, Clark TB, Henegar RB, Lynn DE, Wagner AG, Tully JG, Gasparich GE, Rose DL, Carle P, Bové JM, Konai M, Clark EA, Adams JR, Williamson DL (1996) *Spiroplasma leptinotarsae* sp. nov., a Mollicute uniquely adapted to its host, the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Int J Systematic Bacteriol* 46:906–911. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-906>
63. Goretty CCM, Loera-Muro A, Thelma C, Julian AMC, David MSM, Aarón B (2019) Analysis of the bacterial communities and endosymbionts of natural populations of *Bemisia tabaci* in several crop fields from Mexico semi-arid zone. *Ann Microbiol* 69:.. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01483-6>
64. Toju H, Fukatsu T (2011) Diversity and infection prevalence of endosymbionts in natural populations of the chestnut weevil: Relevance of local climate and host plants. *Mol Ecol* 20(4): 853–868. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04980.x>
65. Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J (2006) Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(41): 15196–15199. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604865103>
66. Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K, Fukatsu T (2012) Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(22): 8618–8622. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200231109>
67. Engel P, Moran NA (2013) The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev* 37(5):699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
68. Xia X, Zheng D, Zhong H, Qin B, Gurr GM, Vasseur L, Lin H, Bai J, He W, You M (2013) DNA Sequencing Reveals the Midgut Microbiota of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.) and a Possible Relationship with Insecticide Resistance. *PLoS One* 8. e68852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068852>
69. Kikuchi Y, Yumoto I (2013) Efficient colonization of the bean bug *Riptortus pedestris* by an environmentally transmitted *Burkholderia* symbiont. *Appl Environ Microbiol* 79(6):2088–2091. <https://doi.org/10.1128/AEM.03299-12>
70. Cheng D, Guo Z, Riegler M, Xi Z, Liang G, Xu Y (2017) Gut symbiont enhances insecticide resistance in a significant pest, the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Microbiome* 5:13. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0236-z>
71. Hrdina A, Serra Canales M, Arias-Rojas A, Frahm D, Iatsenko I (2024) The endosymbiont *Spiroplasma poulsonii* increases *Drosophila melanogaster* resistance to pathogens by enhancing iron sequestration and melanization. *mBio* 14;15(8):e0093624. <https://doi.org/10.1128/mbio.00936-24>
72. Upfold J, Rejasse A, Nielsen-Leroux C, Jensen AB, Sanchis-Borja V (2023) The immunostimulatory role of an Enterococcus-dominated gut microbiota in host protection against bacterial and fungal pathogens in *Galleria mellonella* larvae. *Front Insect Sci* 3:1260333. <https://doi.org/10.3389/finsc.2023.1260333>
73. Hoang KL, King KC (2022) Symbiont-mediated immune priming in animals through an evolutionary lens. *Microbiology (United Kingdom)* 168(4). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001181>
74. Hamilton PT, Leong JS, Koop BF, Perlman SJ (2014) Transcriptional responses in a *Drosophila* defensive symbiosis. *Mol Ecol* 23(6): 1558–1570. <https://doi.org/10.1111/mec.12603>
75. Masson F, Rommelaere S, Marra A, Schüpfer F, Lemaitre B (2021) Dual proteomics of *Drosophila melanogaster* hemolymph infected with the heritable endosymbiont *Spiroplasma poulsonii*. *PLoS One* 16(4):e0250524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250524>
76. Jaenike J, Unckless R, Cockburn SN, Boelio LM, Perlman SJ (2010) Adaptation via symbiosis: Recent spread of a *drosophila* defensive symbiont. *Science* 329(5988):212–215. <https://doi.org/10.1126/science.1188235>
77. Chertkova EA, Grizanov EV, Dubovskiy IM (2018) Bacterial and fungal infections induce bursts of dopamine in the haemolymph of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* and greater wax moth *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol* 153:203–206. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.020>
78. Grizanov EV, Dubovskiy IM, Whitten MMA, Glupov VV (2014) Contributions of cellular and humoral immunity of *Galleria mellonella* larvae in defence against oral infection by *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 119:40–46. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.003>
79. Zwick RK, Ohlstein B, Klein OD (2019) Intestinal renewal across the animal kingdom: comparing stem cell activity in mouse and *Drosophila*. *Am J Physiol-Gastrointestinal Liver Physiol* 316(3): G313–G322. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00353.2018>
80. Wu K, Yang B, Huang W, Dobens L, Song H, Ling E (2016) Gut immunity in Lepidopteran insects. *Dev Comp Immunol* 64: 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.010>
81. Terra WR, Dias RO, Oliveira PL, Ferreira C, Venancio TM (2018) Transcriptomic analyses uncover emerging roles of mucins, lysosome/secretory addressing and detoxification pathways in insect midguts. *Curr Opin Insect Sci* 29: 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.05.015>
82. St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK (1988) The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and

- infection by *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* 52: 459–470.
[https://doi.org/10.1016/0022-2011\(88\)90059-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(88)90059-6)
83. *Hajek AE, St Leger RJ* (1994) Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. *Ann Rev Entomol* 39: 293–322.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.39.1.293>
84. *Rahman MM, Roberts HLS, Sarjan M, Asgarit S, Schmidt O* (2004) Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 2696–2699.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0306669101>
85. *Ayres JS, Schneider DS* (2008) A signaling protease required for melanization in *Drosophila* affects resistance and tolerance of infections. *PLoS Biol* 6(12):2764–2773.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060305>
86. *Khan MM, Kaleem-Ullah RM, Siddiqui JA, Ali S* (2020) Insecticide Resistance and Detoxification Enzymes Activity in *Nilaparvata lugens* Stål Against Neonicotinoids. *J Agricult Sci* 12: 24–36.
<https://doi.org/10.5539/jas.v12n5p24>
87. *Siddiqui JA, Fan R, Naz H, Bamisile BS, Hafeez M, Ghani MI, Wei Y, Xu Y, Chen X* (2023) Insights into insecticide-resistance mechanisms in invasive species: Challenges and control strategies. *Front Physiol* 13: 1112278.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1112278>
88. *Gunning RV, Dang HT, Kemp FC, Nicholson IC, Moores GD* (2005) New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl Environ Microbiol* 71(5): 2558–2563.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2558-2563.2005>
89. *Grizanov EV, Semenova AD, Komarov DA, Chertkova EA, Slepneva IA, Dubovskiy IM* (2018) Maintenance of redox balance by antioxidants in hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella* larvae during encapsulation response. *Arch Insect Biochem Physiol* 98(4): e21460.
<https://doi.org/10.1002/arch.21460>
90. *Munday R, Winterbourn CC* (1989) Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defence mechanism. *Biochem Pharmacol* 38(24): 4349–4352.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90641-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90641-2)
91. *Sies H* (1991) Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am J Med* 91(3C): 31S–38S.
[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90281-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90281-2)

COMPARATIVE ANALYSIS OF IMMUNE RESPONSE, INTESTINAL MICROBIOTA AND SUSCEPTIBILITY TO *BACILLUS THURINGIENSIS* BACTERIA OF THE COLORADO POTATO BEETLE *LEPTINOTARSA DECEMLINEATA*

D. S. Tereshchenko^a, E. V. Grizanov^a, E. V. Shelikhova^a, T. J. Alikina^b,
 M. R. Kabilov^b, and I. M. Dubovskiy^{a, #}

^a*Novosibirsk State Agrarian University, Department of Plant Protection, 630039, Novosibirsk, Russia.*

^b*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch
 of the Russian Academy of Sciences, 630090, Novosibirsk, Russia.*

[#]*e-mail: dubovskiy2000@yahoo.com*

Biological insecticides based on *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) bacteria are highly specific in their action against various types of insects and are considered safe for the environment. One of the most common pests of nightshade crops worldwide is the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. Due to its wide distribution across different climatic regions and rapid development of resistance to chemical insecticides, it raises questions about the mechanisms behind its ecological plasticity and rapid resistance formation to biological insecticides. In this study, we investigated indicators of cellular and humoral immunity, enzyme activity in the antioxidant and detoxification systems, gut microbiota, and susceptibility to *Bt* bacteria in larvae of Colorado potato beetles from different areas of the Novosibirsk Region (NSO). The total number of hemocytes and lysozyme-like antibacterial activity in the hemolymph of insects from the Vengerovsky district of NSO was 1.5–2 times higher than in larvae from the Ordynsky district of NSO. The activity of detoxification enzymes in the intestines and fat body of larvae from Ordynsky increased by 1.7–2.5 times compared to the Hungarian insect group. It has been shown that bacteria of the family *Enterobacteriaceae* and genera *Citrobacter* are the dominant groups of intestinal microbiota in both regions of NSO, but bacteria of the genus *Spiroplasma* predominate in larvae from Ordynsky. It was also found that insects did not differ in their level of sensitivity to *B. thuringiensis*, the development of bacterial infection in the intestines of Colorado potato beetles from different parts of their range causes a two- to three-fold increase in phenoloxidase activity in the hemolymph, while a 1.5-fold increase in the total number of hemocytes has also been recorded in insects from the Ordynsky district in NSO. This suggests that insects from different geographical populations are able to effectively develop a protective strategy against entomopathogens through a balance between innate and induced resistance mechanisms.

Keywords: Resistance, phenoloxidase, hemocytes, entomopathogens, intestinal immunity, metabarcoding, 16S rRNA gene