

Изменение уровня дофамина в гемолимфе личинок капустной
совки *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae)
и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera:
Chrysomelidae) при различных патогенезах

Changes in the dopamine levels of haemolymph of cabbage
armyworm *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae)
and Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say
(Coleoptera: Chrysomelidae) at various pathogenesis

Е.А. Черткова, И.М. Дубовский, О.Н. Ярославцева, Е.В. Гризанова,
В.Ю. Крюков, В.В. Глупов
Е.А. Chertkova, I.M. Dubovskiy, O.N. Yaroslavtseva, E.V. Grizanova,
V.Y. Kryukov, V.V. Glupov

Институт систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе 11, Новосибирск 630091 Россия. E-mail:
chertkaterina@yandex.ru.

Institute of Systematics and Ecology of Animals, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Frunze str. 11, Novosibirsk
630091 Russia.

Ключевые слова: дофамин, стресс-фактор, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii*, *Bacillus thuringiensis*, микозы насекомых, нейрогормон, меланогенез.

Key words: dopamine, stress factor, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii*, *Bacillus thuringiensis*, mycosis, neurohormone, melanogenesis.

Резюме. Выявлено, что воздействие стресс-факторов абиотической природы приводит к повышению уровня дофамина (ДА) в гемолимфе капустной совки *Mamestra brassicae*. При развитии микозов колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* и капустной совки *Mamestra brassicae*, вызванных энтомопатогенными грибами *Beauveria bassiana* и *Metarhizium robertsii*, было показано резкое повышение уровня ДА в гемолимфе. Выяснено, что при инфицировании личинок колорадского жука *L. decemlineata* энтомопатогенными бактериями *Bacillus thuringiensis* уровень ДА в гемолимфе повышается и зависит от количества инфекционного начала.

Abstract. The increase of dopamine (DA) concentration in haemolymph of *Mamestra brassicae* under abiotic stress factors has been detected. We've found that *Beauveria bassiana* and *Metarhizium robertsii* fungal infections induced the enhancing dopamine concentration in haemolymph of *Leptinotarsa decemlineata* and *Mamestra brassicae* larvae. Dopamine concentration in haemolymph of *L. decemlineata* depended from dose of bacterial *B. thuringiensis* infection.

Введение

Инфекционные заболевания насекомых, вызываемые различными патогенами, являются сильнейшим стрессующим фактором для организма насекомого. Патогенные микроорганизмы могут приводить к возникновению эпизоотий как в естественных экоси-

стемах, так и в агроценозах [Raymond et al., 2010; Augustyniuk-Kram, Kram, 2012; Hasan, 2014]. Общеизвестно, что различные энтомопатогены широко используются в качестве агентов биологического контроля для снижения численности насекомых. Наибольшее распространение в качестве агентов биологического контроля получили энтомопатогенные грибы из двух родов: *Metarhizium* (Clavicipitaceae s.str.) и *Beauveria* (Cordycipitaceae), а также энтомопатогенные бактерии *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) [Ownley et al, 2010; Logan, 2012].

Для контроля численности таких опасных вредителей как капустная совка *Mamestra brassicae* (Linnaeus, 1758) и колорадский картофельный жук *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824) довольно успешно применяются биопрепараты на основе энтомопатогенных микроорганизмов, в том числе — энтомопатогенных грибов *Beauveria*, *Metarhizium* и бактерий *Bacillus thuringiensis* [Kryukov et al, 2009].

Воздействие энтомопатогенных микроорганизмов на организм насекомого приводит к активации различных механизмов защиты, направленных на подавление и элиминацию возбудителя инфекции. К таким механизмам относятся реакции клеточного иммунитета — фагоцитоз, инкапсуляция и гранулообразование; гуморального иммунитета — коагуляция, синтез антимикробных белков, активация про-

фенолоксидазного каскада [Satyavathi, 2014]. Установлено, что важную роль в развитии патогенеза играют белки теплового шока (БТШ). Эти молекулы ответственны за защиту белков от повреждений [Feder, Hofmann, 1999]. Они являются индикаторами, показывающими, что организм находится в состоянии стресса и активно развивается стресс-реакция [Lindquist, 1986; Wojda, Tasziow, 2013]. Было показано, что экспрессия Hsp90 повышается при заражении насекомых энтомопатогенным грибом *Beauveria bassiana* [Dubovskiy et al., 2013]. Исходя из этого, можно сказать, что инфекционный процесс не только приводит к активации различных защитных систем организма насекомого, но и способствует выработке сигнальных молекул, свидетельствующих о развитии стресса. Универсальным и эффективным способом защиты насекомых от воздействующих на них стрессирующих факторов является нейроэндокринная стресс-реакция. У насекомых стресс-реакция определена как комплекс эндокринных реакций организма [Raushenbach et al., 1987]. Было установлено, что в стресс-реакцию насекомых вовлечены различные гормоны, в частности, биогенные амины (дофамин, октопамин, серотонин), и гонадотропины (экдистероиды и ювенильный гормон) [Грунтенко, 2008 (Gruntenko, 2008)].

Одним из наименее изученных нейрогормонов при инфекционных процессах остается дофамин (ДА). У насекомых ДА является нейрогормоном, нейромедиатором и нейромодулятором. Кроме того, он участвует в формировании кутикулы [Noguchi et al., 1995; Kim et al., 2000; Theopold et al., 2004; Nappi, Christensen, 2005; Алексеев и др., 2008 (Alekseev et al., 2008); Watanabe et al., 2013]. Опосредованно ДА влияет на синтез других гормонов [Jackson, Westlind-Danielsson, 1994; Yellman et al., 1997; Pendleton et al., 2002; Богомолова и др., 2009 (Bogomolova et al., 2009)]. Кроме того, ДА задействован в поведенческих реакциях, репродуктивной и двигательной активности *Drosophila* [Neckameyer et al., 2000, 2001; Pendleton et al., 2000, 2002; Kume et al., 2005]. Было показано, что вызывают повышение уровня ДА различные экологические стрессоры [Rauschenbach et al., 1993; Hirashima et al., 2000; Rauschenbach et al., 2001; Neckameyer, Weinstein, 2005], а также инфекции различной природы [Noguchi et al., 1995; Alekseev et al., 2007]. ДА способен также регулировать половое поведение насекомых [Brandes et al., 1990; Harris, Woodring, 1995; Sasaki, Nagao, 2001; Harano et al., 2008]. Показано, что ДА влияет на интенсивность такой поведенческой реакции как груминг, который является одним из способов защиты насекомых от паразитов и патогенов [Currie, Stuart, 2001; Libersat 2003; Aubert, Richard, 2008; Libersat et al., 2009; Zhukovskaya et al., 2013; Libersat, Gal, 2013, 2014)]. ДА является неотъемлемой частью проФО каскада, в процессе которого образуются меланотические тромбы, являющиеся характерной чертой течения микозов, а также образующиеся в результате механических повреждений по-

кровов насекомого [Hajek, Leger, 1994; Tang, 2009; Andersen, 2010]. Таким образом, можно сказать, что ДА является одним из важнейших соединений, участвующих в реализации комплекса защитных реакций на действие стресс-факторов. ДА принимает участие в изменении как поведенческих, так и физиологических реакций при влиянии различных стресс-факторов, однако его роль при развитии инфекционных заболеваний насекомых практически не изучена.

Следует отметить, что существует большое количество работ, посвященных детальному изучению влияния различных стрессоров на уровень гормонов и иммунный ответ организма насекомого, однако работы, в которых рассматривается влияние инфекционных агентов на гормональный уровень насекомых, единичны [Алексеев и др., 2007 (Alekseev et al., 2007); Kong et al., 2013]. В первую очередь это касается влияния различных бактериозов и микозов на уровень гормонов стресса, в том числе биогенных аминов, таких как ДА. Настоящая работа посвящена изучению динамики уровня дофамина при различных патогенезах и под влиянием абиотических факторов у капустной совки *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae).

Материалы и методы исследования

Насекомые. Исследования проводились на капустной совке *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) и колорадском жуке *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae).

Личинки колорадского жука были собраны в Новосибирской области на картофельных полях, свободных от обработок инсектицидными препаратами. Личинки содержались в лабораторных условиях при температуре 25°C в вентилируемых пластиковых контейнерах (57x39x42 см), смена корма (листья картофеля *Solanum tuberosum* L.) проводилась ежедневно. Для работы использовали личинок IV возраста.

Яйца капустной совки были собраны на полях капусты белокочанной *Brassica oleracea* L. Личинки первого поколения содержались при температуре 25°C в вентилируемых контейнерах. Смена корма (листья капусты брокколи *Brassica silvestris* L.) производилась ежедневно. В работе использовались личинки V возраста II поколения, полученные в лабораторных условиях.

Энтомопатогенные микроорганизмы. Для заражения колорадского жука *L. decemlineata* использовали бактерии *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* (H8 ab) Bonnifoi and de Barjak var. *tenebrionis* Krieg et al., штамм 2495 из коллекции микроорганизмов ИСиЭЖ СО РАН.

Для исследований использовались штаммы энтомопатогенных грибов *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., Rehner et Humber из коллекции ИСиЭЖ СО РАН

(штамм Р-72) и Всероссийского института защиты растений РАСХН (штамм МАК-1). Штамм Р-72 изолирован в 1972 г. из погибших личинок колорадского жука *L. decemlineata* в Латвии [Serebrov et al., 2007]. Штамм МАК-1 выделен в 2000 г. на юге Новосибирской области из погибших особей итальянского пруса *Calliptamus italicus* L. (Orthoptera: Acrididae). Также для заражения насекомых мы использовали энтомопатогенный гриб *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. штамм САР-31, выделенный на юге Новосибирской области в окрестностях г. Карасук в 2000 г.

Воздействие абиотических стресс-факторов на насекомых. Исследование стресса, вызванного абиотическими факторами, было проведено на личинках капустной совки *M. brassicae*. Для моделирования стресса использовали три модели воздействия: перегрев, переохлаждение и ожог. Для моделирования воздействия высоких температур (перегрева) личинки V возраста помещались в термостат с 50 °С на 2 мин. Забор гемолимфы производили через 10 мин. после извлечения личинок по указанной ниже методике. Для моделирования переохлаждения личинок помещали в морозильную камеру (-18 °С) на 5 мин. Забор гемолимфы производился также через 10 мин. после извлечения. Для моделирования ожога над спиртовкой нагревали иглу, которой прикасались к IV вентральному сегменту тела личинки капустной совки. Через 10 мин. после воздействия производили забор гемолимфы. Подготовленные образцы анализировали на хроматографе.

Заражение энтомопатогенными грибами. Конидии грибов суспендировали в дистиллированной воде (с добавлением 0,03 % Твин-20). Насекомых обрабатывали перкутанно, погружая в водную суспензию на 10 сек. Контрольную группу насекомых обрабатывали дистиллированной водой (с добавлением 0,03 % Твин-20). При заражении личинок *M. brassicae* грибом *B. bassiana* использовали титры 10^5 и 10^8 конидий/мл. Приготовление образцов гемолимфы для измерения концентрации дофамина производили на 1, 2, 3 сутки после заражения. Для заражения личинок *M. brassicae* грибом *M. robertsii* использовали штамм Р-72 (10^5 и 10^8 конидий/мл). Приготовление образцов гемолимфы для измерения концентрации дофамина также производили на 1, 2 и 3 сутки после заражения. В дополнительных экспериментах личинок *L. decemlineata* заражали разными штаммами энтомопатогенного гриба *M. robertsii*. При заражении штаммом МАК-1 и штаммом Р-72 использовали титр 4×10^6 конидий/мл. Приготовление образцов гемолимфы для измерения концентрации дофамина производили на 1, 2 и 3 сутки после заражения.

Заражение энтомопатогенными бактериями. При инфицировании насекомых бактериями проводили обработку корма. Для инфицирования личинок *L. decemlineata* побеги и листья картофеля обрабатывали суспензией, содержащей споро-кристаллическую смесь бактерий (титры $5 \cdot 10^8$ и $2 \cdot 10^9$ спор и кри-

сталлов/мл) ручным опрыскивателем до появления стекающих капель, с последующим высушиванием в течение 20 мин. при температуре 25 °С. Личинки *L. decemlineata* питались на листьях, обработанных бактериями, в течение двух суток, затем в качестве корма использовали необработанные листья картофеля. В контрольных вариантах растения обрабатывали дистиллированной водой. Приготовление образцов гемолимфы для измерения концентрации дофамина производили на 1, 2 и 3 сутки после заражения.

Совместное заражение насекомых энтомопатогенными бактериями и грибами проводили на личинках колорадского жука *L. decemlineata* по вышеуказанным методикам. В варианте с совместным заражением и энтомопатогенными грибами и бактериями сначала проводили обработку насекомых энтомопатогенным грибом *M. robertsii* штамм Р-72, а затем они подсаживались на корм, обработанный энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* var. *tenebrionis* штамм 2495. Титры при заражении: *M. robertsii* — $2 \cdot 10^6$ конидий/мл, *B. thuringiensis* — $2,5 \cdot 10^7$ спор и кристаллов/мл. Приготовление образцов гемолимфы для измерения концентрации дофамина производили на 1, 2 и 3 сутки после заражения.

Определение концентрации дофамина в гемолимфе насекомых. Образцы гемолимфы колорадского жука и капустной совки отбирали в 0,2 М HClO₄. Для приготовления 1 образца гемолимфы личинки колорадского жука отбирали гемолимфу от 3 личинок, от каждой по 16,6 мкл. У личинок капустной совки для приготовления 1 образца использовали гемолимфу от 1 личинки объемом 50 мкл. Гемолимфу смешивали с хлорной кислотой в соотношении 1:1, затем инкубировали в термошейкере Biosan TS 100 при 28 °С и 600 rpm 10 мин. После этого образцы инкубировались при комнатной температуре 20 мин. Затем образцы центрифугировали при 4 °С в течение 10 мин. при 10 000 г. Надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку и центрифугировали еще раз 5 мин. при 10 000 г. Перед загрузкой образца в прибор проводилась его фильтрация.

Измерение количества дофамина в гемолимфе насекомых. Содержание дофамина в гемолимфе измеряли методом внешнего стандарта на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity с электрохимическим детектором Esa Coulochem III (модель ячейки 5010A; потенциал ячейки 300 mV) по методу Груntenко с соавторами [Gruntenko et al., 2005] с модификациями. В качестве стандарта использовали Dopamine hydrochloride (Sigma-Aldrich). Разделение проводили на колонке Zorbax SB-C18 (4,6x250 мм, частицы 5 мкм) в изократическом режиме. Подвижная фаза: 90 % буфера (200 мг/л 1-Octane Sulfonic Acid (Sigma-Aldrich), 3,5 г/л K₂HPO₄) и 10 % ацетонитрила. Скорость потока 1 мл/мин. Обработка хроматограммы проводилась с помощью ПО ChemStation, количество дофамина определяли сравнением площадей пиков стандарта и образца.

Статистическая обработка данных. Данные представлены как среднее арифметическое и его ошибка. Данные были проверены на нормальность распределения при помощи теста Д'Агостино (D'Agostino and Pearson omnibus normality test) и критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk normality test). Для данных с нормальным распределением использовали Т-Тест, а также однофакторный и многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони (one-way, two-way ANOVA, Bonferroni's test). Статистическую значимость различий изучаемых параметров для данных с ненормальным распределением определяли с помощью теста Мана-Уитни (Mann-Whitney U-test) и однофакторного дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана (Kruskal-Wallis test with Dunn's test). Для анализа использованы программы Statistica 6.0, GraphPad Prism v.4.0. (GraphPad Software, USA), Sigma Stat 3.1.

Результаты

Для моделирования абиотического стресса использовались три вида воздействия: перегрев, переохлаждение, ожог. Было показано, что при перегреве у личинок капустной совки *M. brassicae* титр ДА повышается примерно в 7 раз ($p \leq 0,001$). Также было отмечено достоверное ($p \leq 0,001$) увеличение уровня дофамина в гемолимфе личинок капустной совки в варианте с ожогом в 5,5 раз (рис. 1). При воздействии пониженной температуры уровень ДА не изменялся (рис. 1).

При заражении личинок *M. brassicae* энтомопатогенным грибом *B. bassiana* было отмечено достоверное ($p \leq 0,001$) увеличение титра дофамина в гемолимфе насекомых на третьи сутки эксперимента — в 4 раза по сравнению с контролем в варианте с использованием титра конидий 10^8 конидий/мл (рис. 2).

В варианте с заражением капустной совки *M. brassicae* грибом *M. robertsii* достоверных отличий в титре ДА отмечено не было (рис. 3). Однако нами была отмечена та же тенденция, что и в предыдущих экспериментах — повышение титра ДА на

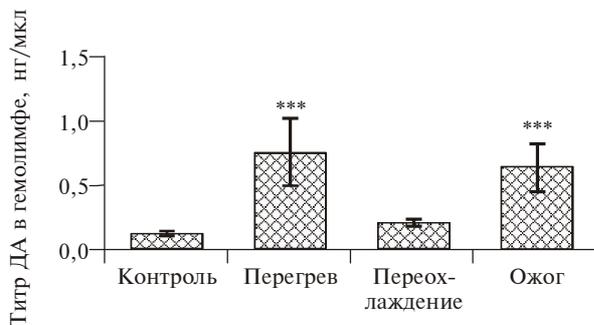


Рис. 1. Изменение титра ДА в гемолимфе *M. brassicae* при воздействии абиотических стресс-факторов; *** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Fig. 1. Concentration of DA in haemolymph of *M. brassicae* under abiotic stress factors; *** — $p < 0.001$ against to control.

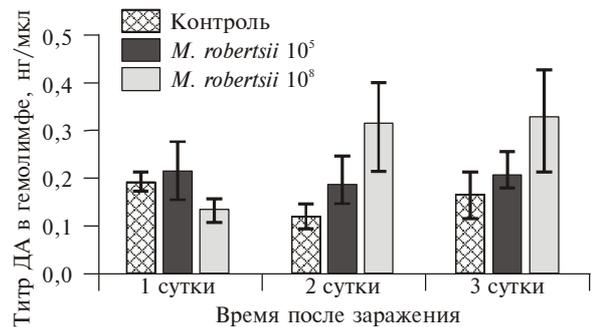
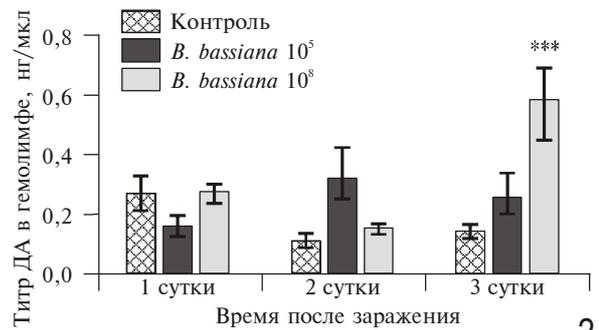


Рис. 2–3. Изменение титра ДА в гемолимфе личинок *M. brassicae* при заражении *B. bassiana* (2) и *M. robertsii* (3); *** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Figs 2–3. Concentration of DA in haemolymph of *M. brassicae* during fungal infection *B. bassiana* (2) and *M. robertsii* (3); *** — $p < 0.001$ against to control.

блюдалось на 2 и 3 сутки и зависело от дозы патогена (рис. 3).

При заражении колорадского жука энтомопатогенным грибом *M. robertsii* с разным типом патогенеза (токсигенный штамм Р-72 и биотрофный штамм Мак-1) было отмечено достоверное ($p < 0,001$) увеличение титра ДА на 3 сутки эксперимента по сравнению с контролем. Кроме того, достоверными оказались различия между биотрофным штаммом (Мак-1) и токсигенным штаммом Р-72. Концентрация дофамина при заражении биотрофным штаммом была достоверно ниже ($p < 0,01$), чем при заражении токсигенным штаммом в 2,5 раза (рис. 4).

При инфицировании личинок колорадского жука бактериями *B. thuringiensis* нами было отмечено достоверное ($p < 0,01$) увеличение уровня ДА (в 20 раз по отношению к контролю у личинок) уже на вторые сутки после заражения в варианте с применением титра бактерий $5 \cdot 10^8$ спор и кристаллов/мл. В варианте с использованием титра $2 \cdot 10^9$ было получено достоверное ($p < 0,001$) увеличение уровня ДА в 30 раз по отношению к контролю. На третьи сутки эксперимента также было получено достоверное ($p < 0,001$) увеличение уровней ДА в гемолимфе по отношению к контролю при использовании двух титров бактерий (рис. 5).

При совместном заражении личинок *L. decemlineata* бактериями и грибами было показа-

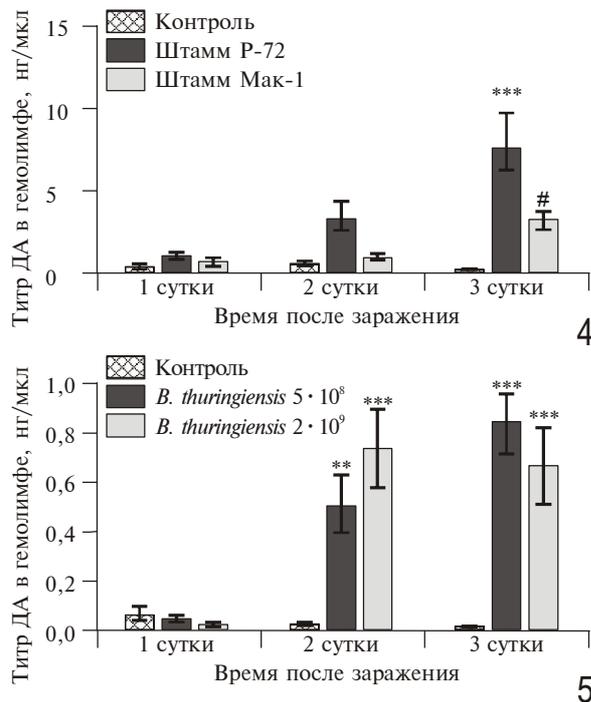


Рис. 4–5. Изменение титра ДА в гемолимфе личинок *L. decemlineata* при заражении разными штаммами гриба *M. robertsii* (4) и бактериями *B. thuringiensis* (5). ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем на те же сутки; # — $p < 0,01$ по сравнению со штаммом P-72.

Figs 4–5. Concentration of DA in haemolymph of *L. decemlineata* larvae during various strains of *M. robertsii* infection (4) and bacterial infection *B. thuringiensis* (5); ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ against to control; # — $p < 0,01$ against to R-72 strain.

но достоверное увеличение уровня дофамина при грибной моноинфекции на 2 и 3 сутки эксперимента. Тенденция к увеличению уровня дофамина наблюдалась на 3 сутки после заражения энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis*. В остальных вариантах эксперимента достоверных отличий в уровнях дофамина отмечено не было (рис. 6).

Обсуждение

Мы установили, что воздействие различных стресс-факторов (высокие температуры, механические повреждения, заражение энтомопатогенными микроорганизмами) приводит к увеличению уровня ДА в гемолимфе стрессированных насекомых. Аналогичные результаты были получены другими исследователями [Rauschenbach et al., 1993; Hirashima et al., 2000; Chentsova et al., 2002]. Так, при изучении влияния абиотических стрессоров на содержание ДА у имаго *Drosophila virilis* было установлено, что через 15 мин. после повышения температуры до 38 °C содержание ДА резко увеличивается. Кроме того, было показано, что уровень дофамина достоверно увеличивается при встряхивании имаго *Drosophila viridis* [Rauschenbach et al., 1993; Hirashima et al., 2000].

Исследования, проведенные на имаго медоносной пчелы *Apis mellifera*, показали снижение титра биогенных аминов, в том числе ДА, в мозге насекомого как при охлаждении (содержание на льду в течение 1 и 3 мин.), так и при повышении концентрации CO₂ и вращении на центрифуге при разных скоростях [Chen et al., 2008]. Это противоречит нашим данным и данным, полученным Раушенбах с соавторами [Rauschenbach et al., 1993]. Возможно, это связано с тем, что в наших работах уровень ДА определялся в гемолимфе насекомых, а не в мозге. Кроме того, отсутствие повышения уровня дофамина при воздействии отрицательных температур может быть связано с замедлением всех метаболических процессов у насекомых, подвергшихся этому воздействию. Полученные нами данные свидетельствуют о сильнейшем стрессе, который испытывают насекомые при воздействии высоких температур и механических повреждений. В результате воздействия повышенной температуры и ожога происходит выброс дофамина, который участвует в комплексе реакций, позволяющих насекомым перенести созданные неблагоприятные условия. При таком сильном воздействии дофамин может выполнять несколько функций: с одной стороны, он секретируется в гемолимфу личинок как нейрогормон, и его действие связано с изменением локомоторной активности, с другой стороны, при механическом повреждении покровов (в данном случае это ожог) происходит формирование меланотического пятна, а дофамин, как известно, является важным звеном меланогенеза.

Кроме того, имеются литературные данные, доказывающие повышение уровня ДА при инфекции. Так, в работе А.А. Алексева и соавторов [Alekseev et al., 2007] показано пятикратное ($p < 0,01$) увеличе-

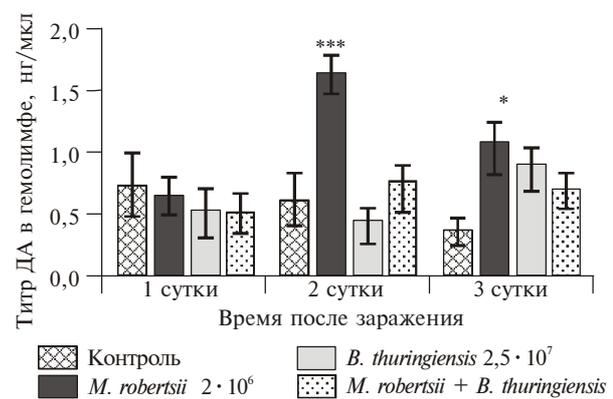


Рис.6. Изменение титра ДА у личинок *L. decemlineata* при развитии микс-инфекции, вызванной энтомопатогенными грибом *M. robertsii* и бактериями *B. thuringiensis*. * — $p < 0,05$, *** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Fig. 6. Concentration of DA in haemolymph of *L. decemlineata* larvae during fungul *M. robertsii*, bacterial *B. thuringiensis* and mixed infections. * — $p < 0,05$, *** — $p < 0,001$ against to control.

ние концентрации дофамина в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* через 48 ч. после заражения энтомопатогенным грибом *Metarhizium anisopliae*. Такой же эффект был установлен нами при заражении личинок *L. decemlineata* и *M. brassicae* энтомопатогенными грибами *M. robertsii* и *B. bassiana* (рис. 2, 3). Отмеченное увеличение титров ДА при заражении личинок может быть связано не только с выбросом данного вещества в качестве нейрогомона при общем стрессировании организма, но и с непосредственным его участием в меланогенезе, который является важнейшим средством защиты организма насекомого от патогенов, проникающих через кутикулу [Dubovskiy et al., 2013].

При заражении колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* штаммами энтомопатогенного гриба *Metarhizium robertsii* с разным типом патогенеза (биотрофный штамм Мак-1 и токсигенный штамм Р-72) выявлено повышение уровня ДА в варианте с обоими штаммами на третьи сутки после заражения (рис. 4). По нашему мнению, существенное различие в уровнях ДА у насекомых при заражении разными штаммами гриба *M. robertsii* скорее всего связано с особенностями течения микозов, характерных для данных штаммов. Более интенсивное прорастание конидий штамма Р-72 (по сравнению с конидиями менее вирулентного штамма МАК-1) приводит к более быстрому проникновению микопатогена в гемоцель и более выраженному ответу со стороны организма насекомого [Kryukov et al., 2011]. Кроме того, нами впервые было выявлено повышение титра ДА в гемолимфе личинок *L. decemlineata* при заражении бактериями *B. thuringiensis* (рис. 5). Это повышение прежде всего свидетельствует о развитии неспецифической стресс-реакции организма насекомого, возникающей в ответ на воздействие данного патогена. Следует подчеркнуть, что бактерии *B. thuringiensis* вызывают кишечный токсикоз, приводящий к лизису эпителиальной ткани кишечника [Portugal et al., 2014; Adang et al., 2014]. Это связано с действием эндотоксина [Hilbeck, Schmidt, 2006]. Нарушение целостности кишечника способствует проникновению в гемоцель различных бактерий, включая бактерии *B. thuringiensis*. Вследствие проникновения и развития инфекции активируется клеточный и гуморальный иммунные ответы организма насекомого [Grizanova et al., 2014]. Так, было показано увеличение активности фагоцитоза и инкапсуляции [Dubovskiy et al., 2008], а также активности фенолоксидаз гемолимфы [Rahman et al., 2004; Grizanova et al., 2014] насекомых при бактериальной инфекции, вызванной *B. thuringiensis*. Исходя из вышеизложенного, можно сказать, что повышение концентрации ДА может быть связано с активацией профенолоксидазного каскада при бактериозе. До конца не понятен вклад ДА в защитные реакции против бактерий, но можно предположить, что повышение его уровня происходит либо в ответ на воздей-

ствии таких стресс-факторов, как токсины бактерий, либо как часть генерализованной стресс-реакции.

Кроме того, мы регистрировали достоверное увеличение титра ДА в эксперименте с совместным бактериально-грибным заражением. Так, на 2 и 3 сутки эксперимента зафиксировано достоверное увеличение титра ДА при грибной моноинфекции (рис. 6). Тенденция к увеличению титра ДА наблюдалась на 3 сутки после заражения энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis*. В остальных вариантах эксперимента достоверных отличий в титре ДА отмечено не было, что, скорее всего, связано с сильнейшей интоксикацией организма насекомого и высокой смертностью при совместном бактериально-грибном заражении.

Полученные результаты позволяют говорить о феноменологической закономерности в ответе на воздействие стресс-факторов различной природы — как абиотических, так и биотических. Вероятно, ключевую роль здесь играют сигнальные пути активации физиологических систем организма насекомого, которые запускаются при нарушении покровов вследствие воздействия температуры, механических повреждений или нарушении функционирования эпителиальных или эпидермальных клеток насекомых (при токсикозах, вызванных энтомопатогенными микроорганизмами). Известно, что ДА как нейрогомон является одним из регуляторов энергетического метаболизма [Груntenко, 2008 (Gruntenko, 2008)], поэтому повышение его уровня может увеличивать эффективность иммунной системы и репарационных процессов в ответ на воздействие патогенов. С другой стороны, увеличение уровня ДА может приводить к изменению вителлогенеза благодаря его способности регулировать уровень ювенильного гормона, который, в свою очередь, регулирует вителлогенез [Gruntenko, Rauschenbach, 2008; Gruntenko et al., 2012]. В данном случае можно говорить о своеобразной «цене» за повышенную устойчивость к инфекциям [Lawniczak et al., 2006]. Данные по влиянию ДА на формирование яйцекладок у насекомых немногочисленны, поэтому достаточно трудно говорить о его значении при формировании яиц, хотя существуют работы, показывающие, что ДА необходим для нормального развития ооцитов [Bloch et al., 2000].

Таким образом, различные энтомопатогены могут выступать как стресс-факторы для организма насекомого. В связи с этим, вполне понятны общие закономерности увеличения уровня ДА при влиянии стрессирующих факторов абиотической природы и патогенов.

Благодарности

Исследования проводились при поддержке гранта Президента РФ МК-6278.2015.4. Разработка метода определения дофамина выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект №15-14-10014).

Литература

- Adang M.J., Crickmore N, Jurat-Fuentes J.L. 2014. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action // *Advances in Insect Physiology*. Vol.47. P.39–87.
- Alekseev A.A., Serebrov V.V., Gerber O.N., Dubovskiy I.M., Glupov V.V., Ushakova M.A., Raushenbach I.Yu. 2008. [Physiological and biochemical difference of single and gregarious larvae of *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Pyraustidae)] // *Doklady Biological Sciences*. Vol.422. No.2. P.270–273. [In Russian].
- Alekseev A.A., Serebrov V.V., Gerber O.N., Ushakova M.A., Komarova T.N., Chentsova N.A., Raushenbach I.Yu. 2007. [Changes of speed of hydrolysis of hormone and dopamine level in haemolymph larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera; Pyralidae) by mycosis] // *Doklady Biological Sciences*. Vol.412. No.5. P.707–709. [In Russian].
- Andersen S.O. 2010. Insect cuticular sclerotization: a review // *Insect biochemistry and molecular biology*. Vol.40. P.166–178.
- Aubert A., Richard F.J. 2008. Social management of LPS-induced inflammation in *Formica polyctena* ants // *Brain, behavior, and immunity*. Vol.22. P.833–837.
- Augustyniuk–Kram A., Kram K.J. 2012. Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (Review) // Blanco J.A. (Ed.): *Forest ecosystems — more than just trees*. Rijeka, Shanghai: In Tech, P.265–294.
- Bloch G., Simon T., Robinson G. E., Hefetz A. 2000. Brain biogenic amines and reproductive dominance in bumble bees (*Bombus terrestris*) // *Journal of Comparative Physiology*. Part A. Vol.186. P.261–268.
- Bogomolova E.V., Adon'eva N.V., Alekseev A.A., Gruntenko N.E., Raushenbach I.Yu. 2009. [Influence of gonadotropins on metabolism of dopamine of sexually mature females of drosophila] // *Doklady Biological Sciences*. Vol.427. No.2. P.257–259. [In Russian].
- Brandes C.H., Sugawara M., Menzel R. 1990. High-performance liquid chromatography (HPLC) measurement of catecholamines in single honeybee brains reveals caste-specific differences between worker bees and queens in *Apis mellifera* // *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part C: *Comparative Pharmacology*. Vol.97. No.1. P.53–57.
- Chen Y.L., Hung Y.S., Yang E.C. 2008. Biogenic amine levels change in the brains of stressed honeybees // *Archives of insect biochemistry and physiology*. Vol.68. P.241–250.
- Chentsova N., Gruntenko N., Bogomolova E., Adonyeva N., Karpova E., Rauschenbach I. 2002. Stress response in *Drosophila melanogaster* strain inactive with decreased tyramine and octopamine contents // *Journal of Comparative Physiology B*. Vol.172. P.643–650.
- Currie C.R., Stuart A.E. 2001. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants // *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. Vol. 268. P. 1033–1039.
- Dubovskiy I.M., Kryukova N.A., Glupov V.V. 2008. Phagocytic activity and encapsulation rate of *Galleria mellonella* larvae hemocytes during bacterial infection by *Bacillus thuringiensis* // *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol.98. P.360–362.
- Dubovskiy I.M., Whitten M.M.A., Kryukov V.Y., Yaroslavtseva O.N., Grizanov E.V., Greig C., Mukherjee K., Vilcinskis A., Mitkovets P.V., Glupov V.V., Butt T.M. 2013. More than a colour change: insect melanism, disease resistance and fecundity // *Proceedings of the Royal Society of London*. Part B: *Biological Sciences*. P.280.
- Feder M.E., Hofmann G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology // *Annual Review of Physiology*. Vol.61. P.243–282.
- Grizanov E.V., Dubovskiy I.M., Whitten M.M.A., Glupov V.V. 2014. Contributions of cellular and humoral immunity of *Galleria mellonella* larvae in defence against oral infection by *Bacillus thuringiensis* // *Journal of invertebrate pathology*. Vol.119. P.40–46.
- Gruntenko N.E., Karpova E.K., Adonyeva N.V., Chentsova N.A., Faddeeva N.V., Alekseev A.A., Rauschenbach I.Y. 2005. Juvenile hormone, 20-hydroxyecdysone and dopamine interaction in *Drosophila virilis* reproduction under normal and nutritional stress conditions // *Journal of insect physiology*. Vol.51. P.417–425.
- Gruntenko N.E., Rauschenbach I. Y. 2008. Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction // *Journal of insect physiology*. Vol.54. P.902–908.
- Gruntenko N.E. 2008. [Stress and reproduction in insects: hormonal control] // *Euroasian Entomological Journal*. Vol.7. Application 1. [In Russian].
- Gruntenko N.E., Laukhina O.V., Bogomolova E.V., Karpova E.K., Menshanov P.N., Romanova I.V., Rauschenbach I.Y. 2012. Downregulation of the dopamine D2-like receptor in *corpus allatum* affects juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster* females // *Journal of insect physiology*. Vol.58. P.348–355.
- Hajek A.E., Leger J.St. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts // *Annual review of entomology*. Vol.39. P.293–322.
- Harano K.I., Sasaki K., Nagao T., Sasaki M. 2008. Influence of age and juvenile hormone on brain dopamine level in male honeybee (*Apis mellifera*): association with reproductive maturation // *Journal of insect physiology*. Vol.54. No.5. P.848–853.
- Harris J.W., Woodring J. 1995. Elevated brain dopamine levels associated with ovary development in queenless worker honey bees (*Apis mellifera* L.) // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. Vol.111. No.2. P.271–279.
- Hasan S. 2014. Entomopathogenic fungi as potent agents of biological control // *International Journal of Engineering and Technical Research*. Vol.2. No.3. P.234–237.
- Hilbeck A., Schmidt J.E.U. 2006. Another view on Bt proteins — how specific are they and what else might they do? // *Biopesticides international*. Vol.2. P.1–50.
- Hirashima A., Sukhanova M.J., Rauschenbach I.Y. 2000. Biogenic amines in *Drosophila virilis* under stress conditions // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. Vol.64. No.12. P.2625–2630.
- Jackson D.M., Westlind–Danielsson A. 1994. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects // *Pharmacology and therapeutics*. Vol.64. No.2. P.291–370.
- Kim M.H., Joo C.H., Cho M.Y., Kwon T.H., Lee K.M., Natori S., Lee T.H., Lee B.L. 2000. Bacterial injection induced syntheses of N- α -alanyldopamine and Dopa decarboxylase in the hemolymph of coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae // *European Journal of Biochemistry*. Vol.267. P.2599–2608.
- Kong H., Cheng Y., Luo L., Sappington T. W., Jiang X., Zhang L. 2013. Density-dependent prophylaxis in crowded Beet in Vol.4. P.609-630.
- Kryukov V.Yu., Dubovskiy I.M., Yaroslavtseva O.N., Levchenko M.V., Slyamova N.D., Belgibaeva A.B., Khodyrev V.P., Lednev G.R., Glupov V.V. 2011. Analysis of two strategies of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* // *Mycology and Phytopathology*. Vol.2. P.164–177. [In Russian].
- Kryukov V.Yu., Khodyrev V.P., Yaroslavtseva O.N., Kamenova A.S., Duisembekov B.A., Glupov V.V. 2009. Synergistic action of entomopathogenic Hyphomycetes and the bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* in the infection of Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata* // *Applied Biochemistry and Microbiology*. Vol.45. No.5. P.511–516. [In Russian].
- Kume K., Kume S., Park S.K., Hirsh J., Jackson F.R. 2005. Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly // *The Journal of neuroscience*. Vol.25. No.32. P.7377–7384.
- Lawniczak M.K., Barnes A.I., Linklater J.R., Boone J.M., Wigby S., Chapman T. 2006. Mating and immunity in invertebrates // *Trends in Ecology & Evolution*. Vol.22. No.1. P.48–55.

- Libersat F. 2003. Wasp uses venom cocktail to manipulate the behavior of its cockroach prey // *Journal of Comparative Physiology A*. Vol.189. P.497–508.
- Libersat F., Delago A., Gal R. 2009. Manipulation of host behavior by parasitic insects and insect parasites // *Annual review of entomology*. Vol.54. P.189–207.
- Libersat F., Gal R. 2013. What can parasitoid wasps teach us about decision-making in insects? // *The Journal of experimental biology*. Vol.216. No.1. P.47–55.
- Libersat F., Gal R. 2014. Wasp voodoo rituals, venom-cocktails, and the zombification of cockroach hosts // *Integrative and comparative biology*. doi:10.1093/icb/ ICU006. P. 1–14.
- Lindquist S. 1986. The heat-shock response // *Annual Review of Biochemistry*. Vol.55. P.1151–1191.
- Logan N.A. 2012. *Bacillus* and relatives in foodborne illness // *Journal of applied microbiology*. Vol.112. No.3. P.417–429.
- Nappi A.J., Christensen B.M. 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity // *Insect biochemistry and molecular biology*. Vol.35. No.5. P.443–459.
- Neckameyer W.S., Weinstein J.S. 2005. Stress affects dopaminergic signaling pathways in *Drosophila melanogaster* // *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*. Vol.8. No.2. P.117–131.
- Neckameyer W.S., Woodrome S., Holt B., Mayer A. 2000. Dopamine and senescence in *Drosophila melanogaster* // *Neurobiology of aging*. Vol.21. No.1. P.145–152.
- Neckameyer W., O'Donnell J., Huang Z., Stark W. 2001. Dopamine and sensory tissue development in *Drosophila melanogaster* // *Journal of neurobiology*. Vol.47. No.4. P.280–294.
- Noguchi H., Hayakawa Y., Downer R.G.H. 1995. Elevation of dopamine levels in parasitized insect larvae // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol.25. No.2. P.197–201.
- Ownley B.H., Gwinn K.D., Vega F.E. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution // *The ecology of fungal entomopathogens*. Springer Netherlands. P.113–128.
- Pendleton R.G., Rasheed A., Hillman R. 2000. Effects of adrenergic agents on locomotor behavior and reproductive development in *Drosophila* // *Drug development research*. Vol.50. No.2. P.142–146.
- Pendleton R.G., Rasheed A., Sardina T., Tully T., Hillman R. 2002. Effects of tyrosine hydroxylase mutants on locomotor activity in *Drosophila*: a study in functional genomics // *Behavior genetics*. Vol.32. No.2. P.89–94.
- Portugal L., Gringorten J.L., Caputo G.F., Soberón M., Muñoz-Garay C., Bravo A. 2014. Toxicity and mode of action of insecticidal Cry1A proteins from *Bacillus thuringiensis* in an insect cell line, CF-1 // *Peptides*. Vol.53. P.292–99.
- Rahman M.M., Roberts H.L., Sarjan M., Asgari S., Schmidt O. 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella* // *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*. Vol.101. No.9. P.2696–2699.
- Rauschenbach I.Y., Gruntenko N.E., Chentsova N. S., Hirashima A., Sukhanova M.Z., Andreenkova E.V., Glazko G.V. 2001. Regulation of reproductive function in *Drosophila* females due to hormonal interaction under stress is genetically determined // *Russian Journal of Genetics*. Vol.37. No.9. P.1041–1048.
- Rauschenbach I.Y., Lukashina N.S., Maksimovsky L.F., Korochkin L.I. 1987. Stress-like reaction of *Drosophila* to adverse environmental factors // *Journal of Comparative Physiology B*. Vol.157. P.519–531.
- Rauschenbach I.Y., Serova L.I., Timochina I.S., Chentsova N.A., Schumnaja L.V. 1993. Analysis of differences in dopamine content between two lines of *Drosophila virilis* in response to heat stress // *Journal of Insect Physiology*. Vol.39. No.9. P.761–767.
- Raymond B., Johnston P.R., Nielsen-LeRoux C., Lereclus D., Crickmore N. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? // *Trends in Microbiology*. Vol.18. P.189–194.
- Sasaki K., Nagao T. 2001. Distribution and levels of dopamine and its metabolites in brains of reproductive workers in honeybees // *Journal of Insect Physiology*. Vol.47. No.10. P.1205–1216.
- Satyavathi V.V., Minz A., Nagaraju J. 2014. Nodulation: An unexplored cellular defense mechanism in insects // *Cellular Signalling*. Vol. 26. P.1753–1763.
- Serebrov V.V., Maljarchuk A.A., Shternshis M.V. 2007. Spontaneous variability of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. strains as an approach for enhancement of insecticidal activity // *Plant sci. (Sofia)*. Vol.44. No.3. P.236–239.
- Tang H. 2009. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila* // *Fly*. Vol.3. No.1. P.105–111.
- Theopold U., Schmidt O., Söderhäll K., Dushay M.S. 2004. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing // *Trends in immunology*. Vol.25. No.6. P.289–294.
- Watanabe T., Sadamoto H., Aonuma H. 2013. Molecular basis of the dopaminergic system in the cricket *Gryllus bimaculatus* // *Invertebrate neuroscience*. Vol.13. P.107–123.
- Wojda I., Tazow P. 2013. Heat shock affects host-pathogen interaction in *Galleria mellonella* infected with *Bacillus thuringiensis* // *Journal of insect physiology*. Vol.59. P.894–905.
- Yellman C., Tao H., He B., Hirsh J. 1997. Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila* // *Proceedings of the national academy of sciences*. Vol.94. P.4131–4136.
- Zhukovskaya M., Yanagawa A., Forschler B.T. 2013. Grooming behavior as a mechanism of insect disease defense // *Insects*. Vol.4. P.609–630.

Поступила в редакцию 12.1.2016